

UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE CLERMONT-Fd

Année scolaire ~~1957-1958~~ 1958

Numéro

2

U

CONTRIBUTION A L'ETUDE CRITIQUE ET EXPERIMENTALE
DE LA
“ SALICYLSULFATASE ”
RÉPARTITION ET EFFECTEURS

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le 24 AVR. 1958

devant

LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE CLERMONT-FERRAND

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ
(Mention : Pharmacie)

par

JEAN TRONCHE

PHARMACIEN

Diplômé d'Hydrologie

Diplômé d'Optique

Examineurs
de la Thèse

M. G. DASTUGUE, Professeur, Président

M^{me} L. BLANQUET, Professeur

M. P. TRONCHE, Maître de Conférences-agrégé

Juges



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548606_0003

UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE DE CLERMONT-Fd

Année scolaire 1956-1957

Numéro

CONTRIBUTION A L'ETUDE CRITIQUE ET EXPERIMENTALE
DE LA
“ SALICYLSULFATASE ”
RÉPARTITION ET EFFECTEURS

THÈSE

présentée et soutenue publiquement le

devant

LA FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE
DE CLERMONT-FERRAND

pour obtenir

LE GRADE DE DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ

(Mention : Pharmacie)

par

JEAN TRONCHE

PHARMACIEN

Diplômé d'Hydrologie

Diplômé d'Optique

Examineurs
de la Thèse

M. G. DASTUGUE, Professeur, Président

M^m. L. BLANQUET, Professeur

M.P. TRONCHE, Maître de Conférences-agrégé

Juges

1957

UNIVERSITÉ DE CLERMONT-FERRAND

FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

DIRECTEUR HONORAIRE :

M. MERLE

DOYEN :

M. PATURET

ASSESEUR :

M^{me} BLANQUET

PROFESSEURS HONORAIRES :

M. FOURNIER J.-B.

M. GAUTHIER

M. MERLE

M. MORNAC

M. PIOLLET Paul

M. RONGIER

M. BUREAU

I. PROFESSEURS TITULAIRES :

- MM. BARRIER - Clinique Chirurgicale A
BAUDON - Obstétrique
M^{me} BLANQUET - Physique
MM. CUVELIER - Hydrologie et Climatologie
DASTUGUE - Pharmacodynamie et Chimie Biologique
PATURET - Anatomie
TERRASSE - Clinique Médicale B
THIEBLOT - Physiologie
WILLEMIN-CLOG - Clinique Médicale Infantile
LATAIX - Pathologie Chirurgicale
BERNARD-GRIFFITHS - Clinique Médicale A
POMMÉ - Clinique Neurologique et Psychiatrique

II. PROFESSEURS SANS CHAIRE :

- MM. FEBVRE - Pharmacie
GERMAIN - Clinique Chirurgicale B
LIMOUSIN - Anatomie Pathologique
PETIT - Médecine Légale
VAURS - Hygiène et Bactériologie

-
- N. - Médecine Opératoire
N. - Clinique Pneumo-Phtisiologique
N. - Pathologie Médicale
N. - Thérapeutique
-

III. MAÎTRES DE CONFÉRENCES-AGRÉGÉS ET AGRÉGÉS :

- MM. BERGERON - Médecine Générale
COULET - Botanique et Cryptogamie
DAUPHIN - Chimie Pharmaceutique
GRAS - Médecine Générale
KRUH - Biochimie Médicale
POURRAT - Matière Médicale
TRONCHE - Pharmacie Chimique
JACQUEMET - Chirurgie Générale
BONHOMME - Histologie

Secrétaire de la Faculté : N.

Conservateur de la Bibliothèque : M. le CHAPELAIN

Bibliothécaire : M. ARCHIMBAUD

La Faculté décide que les opinions émises dans les travaux et mémoires présentés à l'occasion d'une soutenance de thèse de Doctorat en Médecine ou en Pharmacie doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation (délibération en date du 9 Juin 1956).

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

Monsieur le Professeur DASTUGUE

Professeur de Pharmacodynamie et de
Chimie biologique à la Faculté mixte
de Médecine et de Pharmacie.

A NOTRE JURY DE THESE

Madame le Professeur BLANQUET

Professeur de Physique à la Faculté
mixte de Médecine et de Pharmacie
Officier de la Légion d'Honneur.

Monsieur le Professeur Agrégé TRONCHE

Maître de conférences à la Faculté
mixte de Médecine et de Pharmacie.



Hommages respectueux et
très vive gratitude.

A NOTRE MAÎTRE

Monsieur le Professeur DASTUGUE

Professeur de Pharmacodynamie et de
Chimie Biologique.

Membre correspondant de l'Académie
de Pharmacie.

Pharmacien-chef des Hôpitaux de
Clermont-Ferrand.

Docteur en Médecine et en Pharmacie
Docteur-ès-Sciences

Officier de la Santé Publique et de
l'Instruction Publique.

Qui nous a fait le grand honneur d'accep-
ter la présidence de cette thèse après
nous avoir si largement prodigué durant
nos cinq années de Faculté ses sages
conseils tant scientifiques que moraux.

Dont l'érudition et l'esprit scientifique
ont sans cesse orienté et suivi nos re-
cherches, après en avoir inspiré le thème.

Qu'il veuille bien trouver ici l'expres-
sion de notre fidèle attachement et nos
sentiments de très profonde reconnaissance.

A MONSIEUR Pierre BASTIDE

Lauréat de l'Académie de Médecine
Docteur en Pharmacie
Licencié ès-Sciences

Ancien Interne des Hôpitaux
Chef de travaux pratiques à la
Faculté.
Pharmacien des Hôpitaux.

Pour la parfaite obligeance et compétence
qu'il a mises à nous aider et à nous
guider tout au long de la partie expéri-
mentale de nos travaux.

Vif et amical remerciement.

A Madame le Professeur BLANQUET

Assesseur du Doyen
Professeur de Physique à la Faculté
Directeur de l'Institut d'Hydrologie
de Clermont-Ferrand.
Officier de la Légion d'Honneur
Officier de l'Instruction Publique.

En témoignage de notre reconnaissance pour avoir
accepté de participer à la soutenance de cette
thèse et de la grande obligeance avec laquelle
elle a bien voulu accueillir ce mémoire.

Respectueux hommages.

A Monsieur TRONCHE

Maître de Conférences-agrégé à la
Faculté.
Docteur en Médecine et Pharmacie.

Pour la constante bienveillance qu'il nous a
témoignée et en gage de notre profonde gratitude
et de notre respectueux attachement.

A Monsieur DAUPHIN

Maître de Conférences-agrégé à la
Faculté.
Ingénieur chimiste
Docteur en Pharmacie.

En témoignage de notre vive admiration.

A Monsieur DORIER

Directeur du Laboratoire Municipal
Chargé de Cours à la Faculté
Ingénieur chimiste
Licencié-ès-Sciences

Qui a toujours manifesté à notre égard la plus
grande bienveillance.

A TOUS NOS ANCIENS MAITRES DE L'INSTITUTION
SAINTE MARIE DE RIOM

Dont la sollicitude pendant nos sept années de
secondaire nous commande à leur égard la plus
profonde gratitude.
Filial attachement à notre vieux Collège.

A TOUS NOS PROFESSEURS DE LA FACULTE MIXTE
DE MEDECINE ET DE PHARMACIE DE CLERMONT-FERRAND
et de LA FACULTE MIXTE DE MEDECINE ET DE PHAR-
MACIE DE TOULOUSE

Notre respect pour eux n'a d'égal que notre
reconnaissance.

INTRODUCTION

Les sulfatases sont des estérases, dont la découverte remonte à DERRIEN en 1911, et dont on a établi peu à peu la répartition, la classification et les différents rôles physiologiques mais qui, cependant, n'avaient pas fortement attiré l'attention jusqu'à ces dernières années.

Aujourd'hui, au contraire, les sulfatases sont très étudiées par plusieurs équipes d'expérimentateurs. On s'est aperçu en effet que leur importance biologique était plus grande qu'on ne l'avait d'abord soupçonnée. C'est ainsi, par exemple, que les sarcomes du rat manifestent une activité phénolsulfatasique beaucoup plus importante que celle des tissus normaux. Dans un domaine relativement voisin on note que les aminophénols cancérigènes sont ordinairement excrétés sous forme sulfoconjuguée, donc inerte, mais si l'urine renferme des sulfatases capables d'hydrolyser de tels produits de désintoxication, ces enzymes pourraient alors jouer un rôle dans la formation de certains produits cancérigènes. On peut même se demander si l'administration chez l'homme d'inhibiteurs des sulfatases ne pourrait pas avoir parfois une action antihumorale appréciable.

D'autre part un certain nombre de stéroïdes se trouve également dans l'urine sous forme de dérivés sulfo-conjugués et une des manières les plus élégantes de les rendre extractibles est de soumettre les conjugués correspondants à l'action hydrolysante des sulfatases : ainsi a-t-on pu rendre plus sensibles les méthodes de dosages des 17 - cétostéroïdes urinaires auxquels les cliniciens attachent, dans bien des cas, un grand intérêt ; sur un plan plus spéculatif enfin, les stéroïdesulfatases, étant donné leur haut degré de spécificité ont pu servir à préciser la structure même de certains stéroïdes.

Or il se trouve que dans ce groupe des sulfatases, que les travaux de ces dernières années nous ont révélé sous un jour particulier, un nouvel enzyme a été mis en évidence dès 1951 par notre Maître le Professeur DASTUGUE, en collaboration avec ses élèves R. FAVIER et surtout P. BASTIDE et ces auteurs ont été les premiers et même jusqu'à présent, les seuls à envisager la "salicylsulfatase".

Tel est le sujet que le Professeur DASTUGUE nous a confié comme travail expérimental susceptible d'être présenté comme thèse de doctorat en pharmacie.

Notre mémoire est divisé en deux parties :

- une première partie bibliographique où nous exposerons très briève-

ment quelques notions d'ordre général sur les diverses catégories de sulfatases (phénol- , gluco- , chondro- , myro- , et stéroïdesulfatases) ainsi que leur rôle physiopathologique.

- une deuxième partie expérimentale consacrée à l'étude de l'influence de divers facteurs sur la "salicylsulfatase" : acidité ionique, nature du tampon, température, temps d'incubation, temps de concentration de l'enzyme, concentration de l'enzyme et concentration du substrat, électrophorèse et divers effecteurs (anions, cations, eaux minérales, anticcagulants, agents mouillants, alcaloïdes, antibiotiques, acides et sels organiques). Enfin dans un dernier chapitre nous envisagerons la répartition de cet enzyme.

Est-ce à dire d'ailleurs que le système enzymatique que nous avons étudié sous le nom de "salicylsulfatase" corresponde à une sulfatase individualisée et douée, en quelque sorte, d'une personnalité qui lui serait propre ? Cette éventualité n'a, certes rien d'aventureux, étant donné la haute spécificité que cet exposé soulignera de maintes sulfatases, mais nous n'aurions eu le droit de l'affirmer de façon péremptoire qu'après isolement de l'enzyme et malheureusement la jeune Faculté de Médecine et de Pharmacie de Clermont-Ferrand dispose encore d'un matériel trop rudimentaire pour que nous ayons pu nous livrer à des tentatives de ce genre, bien que les expériences d'électrophorèse de zone que nous avons pratiquées soient, dans une certaine mesure, une ébauche à cet égard.

Toutefois, que le système enzymatique ainsi dénommé acquiert un jour ou non, une individualité indiscutable, il est clair que cela ne changera rien vis-à-vis des effecteurs que nous lui avons décrits et c'est ce que nous voulions affirmer en tête de ce mémoire.

Nous ne saurions terminer cette introduction sans exprimer notre respectueuse gratitude à Monsieur le Professeur DASTUGUE qui a dirigé ce travail après en avoir inspiré le thème et nos meilleurs remerciements à son Chef de Travaux Monsieur Pierre BASTIDE dont l'expérience et l'amabilité ont considérablement facilité notre tâche.

Nous voulons marquer ici notre amical souvenir à l'égard de tout le personnel du Laboratoire de Chimie Biologique ainsi que de tous nos camarades qui furent nos voisins de chaque jour dans la recherche : Monsieur et Madame TARRERIAS, Mademoiselle GUETTON, Mademoiselle LACABERE et Messieurs J.M. BARNERIAS , R. GAUTHIER, M. LAVEDRINE et M. VAISSIER.

Nous tenons enfin à exprimer nos remerciements aux Laboratoires THERAPLIX qui nous ont obligeamment procuré le salicylsulfate utilisé dans ce travail.

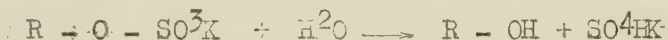
PREMIERE PARTIE

RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES

CHAPITRE I

GENERALITES SUR LES SULFATASES

Les sulfatases sont des enzymes provoquant l'hydrolyse d'une série d'esters sulfuriques suivant la réaction générale :



Ces esters sulfuriques peuvent être soit naturels (comme l'ester indoxyl-sulfurique), soit purement synthétiques (ester glucose sulfurique). Selon FROMAGEOT (58) et différents autres auteurs (140, 124), on peut, suivant la nature des esters sulfuriques hydrolysés, distinguer des phénolsulfatases, des glucosulfatases, des chondrosulfatases, des myrosulfatases et des stéroïdesulfatases.

Phénolsulfatases - La phénolsulfatase est la première connue de toutes les sulfatases ; sa découverte est due à DERRIEN (36), qui en 1911, montra que la "purpurease" existant dans la glande hypobranchiale du Murex trunculus, mise en contact avec l'indoxylsulfate de potassium, hydrolyse cet ester avec libération d'indoxyl libre et de sulfate acide de potassium.

En 1923, NEUBERG et KURONO (103) retrouvent dans la taka-diastase, un agent hydrolysant le phénolsulfate de potassium et c'est à ce ferment que NEUBERG (100) donna le nom de sulfatase, transformé par la suite en celui de phénolsulfatase beaucoup plus précis.

Par la suite, divers auteurs : NEUBERG et WAGNER (108, 109), SODA (141), NEUBERG et HOFMANN (102), NEUBERG et SIMON (106), MOKIMOTO (98), HUGGINS et SMITH (82), JARRIGE et HENRY (85) et ROY (125) mettent au point de nombreuses méthodes tant pour la détection que pour le dosage de l'activité sulfatasique de différents milieux biologiques : bactérie (Alcaligenes metal caligenes), champignons (Aspergillus oryzae), animaux inférieurs (Haliotis, Charonia lampas, Eulota, Lymnea, Ostrea, Tegula, Polypus, Patella), tissus animaux (foie, rein, cerveau, muscle de lapin, de cobaye, de porc et de veau, tumeur du rat) et enfin tissus humains (ROSENFELD (123) et liquides biologiques (sérums, suc digestif d'Helix).

A notre connaissance la liste des différents esters sulfuriques hydrolysés par une quelconque des sulfatases détectées jusqu'alors est la suivante : esters phénolsulfurique, - p. crésolsulfurique, - β naphtholsulfurique, - m. chlorophénolsulfurique, p. chlorophénolsulfurique, - o. nitrophénolsulfurique, - m. nitrophénolsulfurique,

p. nitrophénolsulfurique, - carvacrol sulfurique, - vanilline sulfurique, hydroquinone monosulfurique, - p. oxybenzoylsulfurique, - o. oxyquinoléinesulfurique, - indoxylsulfurique, - m. méthylcyclohexyl p. phénolsulfurique, - p. sec. butylphénolsulfurique, - nitrocatéchol-sulfurique, p. acétylphénylsulfurique.

HOMMERBERG (81), dans un travail comparatif sur la phosphatase et la phénolsulfatase, a étudié l'action des préparations de rein de porc (2, 53), de cerveau de porc et de lapin.

Les conditions physicochimiques de l'activité phénolsulfatase envisagées par les auteurs précédents (102 - 85 - 108) portent notamment sur le pH, la nature et la concentration du tampon, la température, la concentration en enzyme et en substrat, le temps d'hydrolyse et l'influence d'un certain nombre d'ions.

Les valeurs du pH optimum varient de 4 à 8 selon l'origine de l'enzyme et la concentration du tampon auquel on s'adresse.

La nature et la concentration du tampon dans lequel s'effectue expérimentalement l'hydrolyse a fait l'objet de nombreux travaux : c'est ainsi que JARRIGE et HENRY (85), opérant avec différentes dilutions de S.D.H., comme préparation enzymatique et avec le p. nitrophénol comme substrat, réalisèrent dans le mélange réactionnel, mis à incuber une heure à 37°, des concentrations en tampon acétate allant de 0,025 M à 1,8 M et ne constatèrent aucune variation dans l'activité de la phénolsulfatase. Par contre, ces auteurs en s'adressant non plus à un tampon acétate 0,1 M mais soit à un tampon phosphate 0,1 M, soit à un tampon citrate 0,05 M, soit à un tampon citrate-phosphate 0,1 M constatèrent avec ces trois derniers milieux réactionnels une activité plus réduite qu'avec le tampon phosphate : 12 p. 100 d'inhibition (tampon citrate), 48 p. 100 (tampon phosphate) et 77 p. 100 (tampon citrate-phosphate).

L'hydrolyse du p. nitrophénylsulfate par le S.D.H. à + 4° pendant une heure est 12 fois moindre qu'à + 37°. D'autre part, le S.D.H. maintenu 30 minutes à + 52° ne subit pas d'inactivation, mais à + 58°, 42 p. 100 de l'activité est supprimée.

HUGGINS et SMITH (82) ont trouvé une relation linéaire entre le taux d'hydrolyse du p. nitrophénolsulfate et la concentration en enzyme (takadiastase ou homogénat de foie de rat). De même JARRIGE et HENRY (85) constatèrent une relation linéaire entre les activités de dilutions de S.D.H. (suc digestif d'Helix) 1/500 - 1/1000 - 1/1500 - 1/2000, par contre ils remarquèrent une baisse d'activité quand la dilution en S.D.H. dépasse ces limites.

TANAKA (156) trouva que le maximum d'hydrolyse du p. nitro-

phénylsulfate par les extraits de glandes digestives d'organismes marins était atteint avec une concentration en substrat 0,0005 M quand le pH est de 5,0 - 5,2.

En 1947, HUGGINS et SMITH (82) trouvèrent que la vitesse maxima de l'hydrolyse du p. nitrophénylsulfate de potassium par une solution aqueuse de takadiastase est atteinte avec une concentration en substrat de 0,015 M ; l'activité diminuant très rapidement pour des concentrations inférieures en substrat alors que pour des concentrations supérieures, elle ne décroît que très lentement.

D'après JARRIGE et HENRY (85), la vitesse de l'hydrolyse du p. nitrophénolsulfate par une dilution de suc d'Helix 1/2000 - 1 h. à 37° est maxima pour une concentration en p. nitrophénylsulfate de 0,0005 M, l'activité enzymatique décroissant très vite comme précédemment pour des concentrations inférieures et plus lentement pour les concentrations supérieures.

DODGSON, LEWIS et SPENCER (38) établirent les concentrations optima en substrat pour l'activité des préparations arylsulfatasiques de différentes origines sur le p. acétylphénylsulfate de potassium.

Ainsi les concentrations optima pour les arylsulfatases du rat, Aspergillus oryzae et Homme sont à peu près identiques mais très différentes de celles relatives à l'enzyme des mollusques.

La concentration finale optima en 2 - hydroxy - 5 - nitrophénylsulfate de potassium (nitrocatécholsulfate) est de 0,005 M pour son hydrolyse par des extraits de Patella en tampon acétate 0,1 M à pH 5,6.

HUGGINS et SMITH (82) ont constaté une relation linéaire de l'activité enzymatique en fonction du temps d'hydrolyse variant de 1/2 heure à 4 heures : ces auteurs, comme nous l'avons déjà dit, étudiaient l'hydrolyse du p. nitrophénylsulfate par la takadiastase à 1,6 pour 100.

Par contre DODGSON, LEWIS et SPENCER (38), travaillant sur des extraits de Patella et Littorina et avec le p. acétylphénylsulfate de potassium pour substrat n'ont pas retrouvé une courbe du degré d'hydrolyse linéaire à mesure qu'augmente le temps d'incubation.

Nous allons voir dans les paragraphes suivants la question des effecteurs de la salicylsulfatase : le carbonate de baryum, d'après NEUBERG et WAGNER (110) ne semble pas avoir sur la phénolsulfatase l'action toxique qu'il présente souvent vis-à-vis des phénomènes biologiques. Au contraire, le carbonate de magnésium produit une inhibition notable de l'action de la phénolsulfatase, d'après NEUBERG

et LINHARDT (104).

Ce fait a conduit HOMMERBERG (81) a étudier l'action des ions magnésium ; lorsque la solution en expérience contient 1,25 % de chlorure de magnésium, toutes conditions égales d'ailleurs, l'on constate une inhibition de l'action de la sulfatase correspondant à une diminution de vitesse d'hydrolyse de 10 p. 100 environ par rapport au témoin.

D'après HOMMERBERG (81) l'addition de phosphate de soude au milieu réactionnel abaisse la vitesse d'hydrolyse d'environ 28 p. 100. Cette action des phosphates est étroitement liée à l'accélération de l'hydrolyse qui se produit après lavage des préparations de rein avec de l'eau distillée ; ce lavage élimine une certaine quantité de phosphate (égale, dans l'exemple donné par HOMMERBERG (81) à 17 mg de P_2O_5 par gramme de tissu), et l'accélération de l'hydrolyse du phénolsulfate chez les tissus lavés correspond quantitativement à l'inhibition que l'on observe chez ces mêmes tissus, lorsqu'on leur ajoute cette même quantité de phosphate qui leur avait été enlevée par lavage.

D'autre part, l'élimination au fur et à mesure de sa production du phénol libéré accroît également le degré auquel s'arrête l'hydrolyse : c'est ainsi que si l'on ajoute au milieu une quantité de toluène égale aux trois quarts du volume du liquide en expérience, au lieu de 1 % dans les conditions expérimentales habituelles de NEUBERG et WAGNER (111), le phénol libéré de l'ester phénolsulfurique s'y dissout facilement et l'hydrolyse au bout de 12 jours, toutes conditions par ailleurs restant égales, atteint 45 p. 100 au lieu de 35 p. 100.

JARRIGÉ et HENRY (85) trouvèrent une inhibition de l'activité diastasique de l'ordre de 80 p. 100 avec une concentration de 20 mg de FNA par 100 ml dans le mélange réactionnel contenant la préparation enzymatique (suc d'Helix) et le substrat (p. nitrophénylsulfate de potassium) ; une inhibition de 40 p. 100 avec une concentration de 40 mg d'acide ascorbique par 100 ml, une inhibition de 40 p. 100 encore avec une concentration de 20 mg (en ions Cu^{++}) de SO_4Cu ; une inhibition de 48 p. 100 avec une concentration de 20 mg d'acétate d'urane par 100 ml et enfin aucune inhibition avec des concentrations de 20 à 40 mg d'acétate de mercure par 100 ml, de 20 mg d'oxalate de potassium et de 20 mg de nitrate d'argent.

En 1953, DODGSON et SPENCER (41) et deux ans plus tard, ROY (126) étudient l'effet d'un certain nombre d'effecteurs sur la "nitro-catécholsulfatase" de Patella : l'inhibiteur est dissous dans le tampon acétate, de telle sorte que par la suite la préparation enzymatique est additionnée au substrat et à l'inhibiteur précédemment mélangés. Les résultats de ces différents auteurs concordent et sont résumés dans le tableau suivant :

Effecteurs	Témoin	Glucose	Glucose 6-Sulfate	Na Cl	K Cl	Na ² SO ₄	NaH ² PO ₄	Na F
Concentration	0	0,5	0,025	0,05	0,05	0,005	0,005	0,005
% activité	100	80	-	118	-	95	16	26

L'activation de cette arylsulfatase par les ions Cl⁻ est particulièrement intéressante à retenir.

Différents auteurs se sont attachés également à l'influence de l'urine sur l'activité sulfatasique.

La phénolsulfatase, sous forme de takadiastase se montre parfaitement capable, d'après NOGUSKI (112), de fonctionner dans l'urine de cheval, de mouton et de lapin, en présence de toluène (1 à 2%) et en hydrolysant les esters sulfuriques qui existent naturellement dans l'urine de ces animaux (esters phénol-, p. crésol- et indoxylsulfuriques). Par contre, l'arylsulfatase de mollusques (Patella) est fortement inhibée par l'urine : cette inhibition est due aux phosphates et sulfates qui, à la concentration 0,02 M inhibent l'arylsulfatase de Patella, respectivement de 100 et 43,7 p. 100 et l'arylsulfatase fongique seulement de 4 à 19 et de 0 p. 100 : ROBINSON et SMITH (122). DZIALOSZYNSKI (50) attribuait l'effet inhibiteur de l'urine sur la sulfatase à l'urée qui inhibe l'enzyme en solution pure dans le tampon.

Vu l'emploi éventuel de préparations arylsulfatasiques pour l'hydrolyse des estersulfates de l'urine, DODGSON et SPENCER (42) étudièrent l'effet de l'urine sur l'activité de préparations purifiées de glucuronidase et arylsulfatase : l'enzyme est inhibé très fortement. Dans une expérience typique, l'urine de lapin causa 91,5 p. 100 d'inhibition et l'urine humaine 87,8 p. 100. Dans une autre expérience, un mélange d'urine de lapin (10 ml) à pH 5,5 et tampon acétate 0,5 M (10ml) au même pH contenant 70,6 mg de p. acétylphénylsulfate de potassium est mis à incuber avec une poudre ayant une activité de 20.000 unités. Après une heure il y a 8,5 p. 100 d'hydrolyse et après 16 heures seulement 20 p. 100.

En absence d'urine, l'hydrolyse était complète en 11 heures. La cause de l'inhibition de l'arylsulfatase était expliquée en testant l'effet sur l'enzyme de plusieurs constituants communs de l'urine :

Composé	Aucun	Urée	NaCl	KCl	K ² SO ₄
Molarité	-	0,02	0,02	0,02	0,01
Activité p. 100	100	98,6	110,3	111,3	56,3

Composé	KH ² PO ₄	Phénylhy- drazine hydro- chlorure	Mg Cl ²	Ba Cl ²	Mg acétate
Molarité	0,02	0,0005	0,02	0,1	0,02
Activité p. 100	0	124,0	109,3	107,5	97,8

A la lecture de ces tableaux, l'urée apparaît n'avoir aucune influence sur l'action arylsulfatasique et les différents chlorures ont un léger effet activateur. L'inhibition par l'urine pourrait être attribuée, toutefois, à la présence des ions sulfates et phosphates, reconnus tous deux comme des inhibiteurs de l'arylsulfatase. Ces auteurs font remarquer que l'inhibition par les phosphates n'est pas due à une variation dans le pH maximum de l'enzyme. La précipitation des ions sulfates seulement par le chlorure de baryum à pH 5,5 ne réduit pas l'effet inhibiteur de l'urine, même après suppression du précipité de sulfate de baryum par centrifugation. Les ions phosphates peuvent donc être regardés comme la cause majeure de l'inhibition. Mais si l'urine est libérée des sulfates et phosphates, elle communique par contre un léger effet activateur qui peut être attribué à une augmentation de la concentration des ions chlorures ajoutés comme le chlorure de baryum. Pour obtenir cette double précipitation des ions sulfates et phosphates, on alcalinise les urines à pH 11,5 et on ajoute du chlorure de baryum (0,2 M) ; le précipité est ensuite éliminé par centrifugation.

Enfin, l'effet de certains ions varie suivant l'origine de l'arylsulfatase : ainsi les ions chlorures activent l'enzyme des mollusques et l'arylsulfatase du foie de rat, mais n'ont pas d'effet sur l'arylsulfatase de la takadiastase. (ROBINSON et ses collaborateurs(122)).

SELIGMAN, CHLUNCEY et NACHLAS (136) établirent que le chlorure de magnésium active l'arylsulfatase du foie de rat de 50 p. 100 mais l'action serait moins forte sur l'enzyme de Patella. D'après DZIALOSZYNSKI (51) la phénylhydrazine 0,00001 M inhibe complètement l'arylsulfatase de Clarase, tandis que le chlorhydrate de phénylhydrazine active celle des viscères.

En somme l'effet des ions inorganiques sur les arylsulfatases de sources différentes, combiné à la cinétique proprement dite de ces enzymes sur le même substrat, suggère qu'il y a des différences fondamentales entre les arylsulfatases. On ne peut donc extrapoler les conclusions obtenues de l'étude d'une sulfatase à toutes les autres arylsulfatases.

Glucosulfatases - Travaillant sur des escargots du genre Eulota, SODA et HATTORI (145) découvrirent en 1931 une diastase hydrolysant l'ester glucose - 6 - sulfurique et démontrèrent de façon indiscutable la non identité de la glucosulfatase et de la phénolsulfatase. La glucosulfatase est également présente chez de nombreux mollusques : le Charonia lampas et le Viviparus japonicus étant les deux espèces de la classe des gastropodes à en renfermer le plus dans leur foie. L'existence d'une glucosulfatase a été encore mise en évidence par B. TANKO (157) chez le Bactérium fluorescens non liquefaciens.

Les premières préparations de glucosulfatase ont été obtenues par SODA et HATTORI (146).

De nombreux essais de purification ont été tentés et finalement SODA et EGAMI (142) ont décrit une méthode de purification de l'enzyme telle que le produit obtenu soit plus de vingt fois plus actif que la préparation initiale. Cette méthode, qui tient compte de l'inhibition des phosphates vis-à-vis de la glucosulfatase, a pour résultat, entre autres substances, l'élimination des phosphates que contient toujours plus ou moins la solution enzymatique employée.

La glucosulfatase ne borne pas son action à l'hydrolyse de l'ester glucosulfurique, mais elle est capable d'agir sur une série d'autres esters sulfuriques des glucides ou de leurs dérivés (140). SODA et HATTORI (148) ayant isolé de certains mollusques un ester sulfurique très impur, l'ont mis en présence de glucosulfatase à pH 5,1 et obtenu 8,3 p. 100 d'ions sulfates en quatre jours et 32,6 p. 100 en 14 jours. Il est très important de souligner ici que l'hydrolyse de l'acide chondroïtine sulfurique est pratiquement nulle dans les mêmes conditions où celle du glucose-sulfate atteint près de 80 p. 100 : glucosulfatase et chondrosulfatase sont donc bien des enzymes différents. Malgré la diversité des substrats attaqués par cet enzyme, SODA (140) propose le nom de "glucosulfatase" pour cette diastase, parce que l'acide glucosulfurique est le plus facilement hydrolysé parmi tous les acides glucidosulfuriques. La glucosulfatase est complètement détruite en 20 à 30 minutes à 80° et en 5 à 15 minutes à 100°.

En ce qui concerne les effecteurs, SODA (141) a démontré que les acétates et les chlorures, lorsque leur concentration reste faible, n'ont pas d'influence sur le fonctionnement de la glucosulfatase,

mais ce fonctionnement est fortement ralenti par les ions fluorures, phosphates, borates et sulfates. L'inhibition par les fluorures est particulièrement importante : celle par les sulfates est la plus faible. Enfin il suffit d'une concentration 0,5 M en borates ou en phosphates pour arrêter totalement l'hydrolyse. Il est à remarquer, toujours d'après SODA (140), que ^{dans} la plupart des foies de mollusques qui servent à préparer la glucosulfatase, il existe constamment une quantité plus ou moins importante d'ions phosphates ; il est donc nécessaire, au cours de la purification de la solution enzymatique, d'éliminer ces sels, par dialyse par exemple. L'influence inhibitrice des sulfates apparaît de façon particulièrement nette lorsque l'on compare l'hydrolyse fermentaire du glucosulfate en présence et en absence d'ions baryum. SODA et EGAMI (143) ont constaté que si l'activité de la glucosulfatase est déjà ralentie par les phosphates, l'action inhibitrice des sulfates ne se fait plus sentir.

D'après SODA et KAWAMATSU (149), dans une série d'invertébrés, les concentrations en glucosulfatase et en phénolsulfatase sont du même ordre de grandeur, toutefois, certains mollusques qui renferment beaucoup de glucosulfatase ne contiennent pratiquement pas de phénolsulfatase. SODA et KAWAMATSU (150) ont encore comparé l'action du phénol sur la phénolsulfatase et la glucosulfatase ; l'addition de phénol 0,2 M à une préparation de phénolsulfatase modifie les propriétés colloïdales du ferment et provoque un trouble du milieu. Ces modifications n'apparaissent pas lorsque la concentration du phénol reste en-dessous de 0,1 M. L'action inhibitrice du phénol sur la réaction fermentaire est proportionnelle à la quantité de phénol ajouté quand la concentration de ce corps reste inférieure à 0,1 M ; au contraire, le phénol ne présente pas d'action inhibitrice vis-à-vis de la glucosulfatase jusqu'à la concentration 0,2 M, au-dessus de laquelle l'inhibition observée est probablement due à l'action destructrice du phénol.

Chondrosulfatase - L'existence d'une chondrosulfatase a été rendue probable dès 1914 lorsque NEUBERG et RUBIN (105) ont constaté la formation, entre autres substances, de sulfate minéral à partir d'acide chondroïtine sulfurique sous l'action de bactéries "putréfiantes". Mais ce n'est qu'en 1931 que NEUBERG et HOFMANN (102) ont démontré l'existence de la chondrosulfatase en obtenant à partir d'un organisme voisin du B. Fluorescens non liquefaciens une préparation capable de séparer quantitativement le radical sulfate de l'ester chondroïtine sulfurique.

Plus tard on a trouvé de la chondrosulfatase chez diverses bactéries : B. Proteus, B. Pyocyaneus. N'existant ni chez les moisissures du type Aspergillus, ni chez les végétaux supérieurs de la famille des crucifères, sa recherche dans différentes préparations d'organes des animaux supérieurs (reins, tendons) n'a pas permis d'obtenir d'une façon certaine la libération de sulfate minéral à partir d'acide

chondroïtine sulfurique. Par contre, signalons que l'on a pu saisir la formation de chondrosulfatase dans les cellules bactériennes vivantes au cours de leur développement.

Enfin il est à noter que les préparations de chondrosulfatase n'attaquent ni l'acide glucose sulfurique, ni le sinigroside. Elles hydrolysent l'acide glucose sulfurique ; mais la glucosulfatase et la chondrosulfatase sont toutefois des enzymes différents.

Myrosulfatase - Nous permettant de renvoyer le lecteur à la revue générale consacrée au ferment des graines de Brassica nigra : la myrosine, par Madame GAUTIER (64) dans le mémoire encore inédit : "Sur l'appréciation de la vitesse d'hydrolyse enzymatique du sinigroside à partir de la farine de moutarde noire", nous nous contenterons de souligner les quelques points suivants :

Dans les graines de moutarde blanche, Sinapis alba, c'est le sinalbósíde qui, sous l'influence de la myrosine donne naissance au sénevol sinalbique, tandis que dans les graines de Brassica nigra, le sinigroside ou myronate de potassium donne naissance au sulfocyanate d'allyl ou sénevol allylique.

C'est à GUIGNARD (70) en 1890, qu'est revenu le mérite à l'aide du réactif de Millon et de HCl de préciser la répartition du ferment. Les noms donnés à l'enzyme myrosine sont les suivants :

Myrosinase par OPPENHEIMER (114) et
Sinigrase par Von EULER (161).

Von EULER (161) émit l'hypothèse d'une constitution de l'enzyme en deux parties :

- une glucosidase dont l'action se manifeste en moins de quinze minutes ;
- une sulfatase dont l'action commence seulement après sept heures et demie ;

NEUBERG et WAGNER (110) découvrirent dans les tissus animaux un nouvel enzyme capable de détacher le radical sulfate de la sinigrine, sans causer la moindre hydrolyse de la liaison glucosidique et c'est à cet enzyme qu'ils donnèrent le nom de myrosulfatase. Le substrat spécifique de la myrosulfatase est la sinigrine, substance que l'on a préparée à l'état pur.

L'action de la myrosulfatase se limite à la libération du radical sulfurique, attaché au radical organique du substrat, comme dans le cas de la phénolsulfatase et de la glucosulfatase.

Quant à la thioglucosidase, deuxième constituant de la my-

rosinase, elle a été mentionnée par STIG VEIBEL (153) et son isolement a été effectué en 1937 par COSTA (28) ; c'est elle qui est responsable de la rupture du sinigroside en essence de moutarde et glucose. Ces deux enzymes sont actifs sur une grande échelle de pH (de 4,4 à 7,0) mais la solution d'enzymes a un maximum de stabilité à pH 5 - 6 . La sulfatase est plus stable que la glucosidase à pH 3 et la thioglucosidase est plus stable que la glucosidase à pH 7.

Ces deux enzymes ont été préparés séparément par une méthode décrite par FROMAGEOT (60) ainsi que par NEUBERG et SCHOENBERG (107).

En dehors des plantes à essences sulfurées, la myrosulfatase n'existe pas dans la plupart des types d'Aspergillus , ni chez les bactéries. Elle est présente chez les crucifères et enfin, chez les animaux supérieurs, on en trouve dans le foie, le muscle et les reins du cheval et du lapin ; tandis que la thioglucosidase, qui est une β glucosidase suivant PIGMAN (120), existe seulement chez les plantes à glucosides sulfurés : les levures, les moisissures et les bactéries ; les sucs digestifs d'invertébrés n'en renferment pas la moindre trace : c'est ainsi que selon GIAJA (65) "le suc digestif d'escargot, source inépuisable de ferments, ne contient pas la moindre trace de myrosinase", résultat retrouvé en 1954 par BASTIDE (6).

Stéroïde sulfatases : JAYLE et BAULIEU (86), signalèrent en 1954, dans le S.D.H. une diastase hydrolysant un sulfate (synthétique) de déhydroépiandrosterone ; STITCH et HALKERSTON (154) et ROY (126) constatèrent dans les extraits d'un mollusque : Patella vulgata cette même activité enzymatique et dénommèrent cette diastase : stéroïde sulfatase. De même, un enzyme hydrolysant toujours ce dernier substrat a été trouvé chez Otala punctata par SAVARD, BAGNOL et DORFMAN (130). Ces enzymes hydrolysant le même substrat et découverts chez trois mollusques différents (Helix, Patella et Otala) semblent présenter des propriétés générales similaires, sans toutefois qu'aucun d'eux n'ait été beaucoup étudié au point de vue cinétique.

Dans les conditions expérimentales employées, il y avait une relation directe entre la concentration de l'enzyme et la vitesse de réaction qui est constante au moins pendant deux heures. Au bout de ce temps, 40 p. 100 du substrat initialement présent avait été hydrolysé. La concentration optima en substrat se situe autour de 0,2 m M de déhydroépiandrosteronesulfate et la constante Km est approximativement 0,04 m M de déhydroépiandrosteronesulfate.

Le pH 4,5 est retenu comme le pH optimum en tampon acétate.

Différents effecteurs de la stéroïdesulfatase ont été étudiés par ROY (124) en ajoutant l'enzyme, ou plus exactement la solution d'extraits de Patella au mélange substrat et inhibiteur. C'est ainsi

que le glucose à la concentration 0,5 M n'a aucune action, tandis que le glucose - 6 - sulfate à 0,025 M exerce 30 p. 100 d'inhibition, le NaCl 0,05 M : 25 p. 100 d'inhibition, KCl 0,05 M : 26 p. 100, Na₂SO₄ 0,005 M : 75 p. 100 d'inhibition, NaH₂PO₄ 0,005 M : 98 p. 100 d'inhibition et enfin NaF 0,005 M : 90 p. 100 d'inhibition.

Il est intéressant de noter l'inhibition de la stéroïdesulfatase par les ions Cl⁻, alors que dans les mêmes conditions, nous l'avons vu plus haut, nous avons une activation de l'arylsulfatase. De même le glucose, que l'on sait inhibiteur pour la glucosulfatase, est sans action ici.

Les préparations enzymatiques de Patella n'hydrolyseraient pas, à un taux décelable tout au moins, les sulfates du cyclohexanol, de l'alcool benzylique ou du dichlorophénoxy-éthanol, suggérant ainsi que la stéroïdesulfatase n'est pas une alkylsulfatase générale. L'hydrolyse du cortisone-21-sulfate par des extraits de Patella est due sans doute, non pas à la stéroïdesulfatase, mais à quelqu'autre sulfatase présente dans la préparation ; car les effecteurs de ce dernier enzyme donnent des pourcentages d'inhibition qui ne coïncident pas avec ceux que l'on obtient en général avec la stéroïdesulfatase. Toutefois, l'hydrolyse du cortisonesulfate suit de près celle du déhydroépiandrostéronesulfate et aucune séparation des deux activités n'a été possible (même par électrophorèse). Ainsi malgré la différence d'action des mêmes effecteurs, aux mêmes concentrations, un seul enzyme est peut-être malgré tout responsable de l'hydrolyse de ces deux substrats.

Enfin, on rencontre toujours chez Patella l'arylsulfatase et la stéroïdesulfatase, l'une à côté de l'autre, même après la mise en oeuvre des moyens de fractionnement usuels ; aussi ROY (124) pensa-t-il que l'électrophorèse sur papier permettait leur séparation. Sans avoir obtenu par ce moyen la séparation complète attendue, les activités aryl et stéroïdesulfatasiques étaient suffisamment séparées sur la bande de papier électrophorétique pour permettre de conclure à une distinction entre ces deux enzymes.

CHAPITRE II

APPLICATIONS BIOLOGIQUES ET ROLE PHYSIO-PATHOLOGIQUE DES SULFATASES

I - APPLICATIONS BIOLOGIQUES

a)- Stéroïde-sulfatases dans le dosage des stéroïdes urinaires

Les 17-cétostéroïdes sont éliminés dans les urines sous forme de conjugués hydrosolubles et JAYLE et BAULIEU (86) ont vérifié à maintes reprises qu'il n'y avait pas de 17-cétostéroïdes libres directement extractibles par l'éther lorsque les urines étaient traitées moins de 24 heures après leur émission. Si certains 17-cétostéroïdes sont glycuco-conjugués, tels l'étio-cholanolone et l'androstérone, WEST, REICH et SAMUELS (165), d'autres 17-cétostéroïdes sont par contre sulfoconjugués et ne sont pas hydrolysés par les glycuronidases d'origine bactérienne ou animale souvent utilisées pour hydrolyser les stéroïdes conjugués de l'urine.

COHEN et BITMAN (27) ont établi que les 3 β -17-cétostéroïdes ayant une double liaison en position 5-6 se trouvaient dans les urines à l'état de sulfoconjugués, qui sont libérés par hydrolyse ménagée en chauffant les urines pendant quatre heures à pH 5,8 ; ce fait a été confirmé par JENSEN et TOTTERMAN (87 - 88) et par JAYLE et BAULIEU (86).

Les phénolsulfatases bactériennes hydrolysent une partie des oestrogènes conjugués (24 - 25 - 26 - 116) ; elles n'hydrolysent pas les 17-cétostéroïdes conjugués (9).

C'est le mérite de JARRIGE, HENRY et THEVENET (77 - 76 - 85) d'avoir établi les premiers que le suc gastrique d'Helix pomatia contient des sulfatases qui s'attaquent aux sulfates des 17-cétostéroïdes ; sulfatases qui se trouvent également dans le suc de Patella comme l'a montré DODGSON (39 à 44) ; selon cet auteur, il ne s'agirait cependant pas d'une véritable alcoylsulfatase.

Les résultats de JAYLE et BAULIEU (86) indiquent que les activités sulfatasiques des urines, mentionnées par HUGGINS (82) et ODELL (113), sont toujours très faibles.

L'ensemble des résultats obtenus par JAYLE et BAULIEU (86) avec le procédé TALBOT, la glycuronidase de rate, de bovidés et les

enzymes de suc d'Helix laissaient supposer qu'en moyenne 60 à 65 p. 100 des 17-cétostéroïdes de l'urine d'homme normal sont glycuco-conjugués, 20 à 30 p. 100 sulfo-conjugués et 10 à 15 p. 100 conjugués à une substance inconnue.

Les travaux de DODGSON et collaborateurs (44) indiquent que l'activité sulfatasique des extraits de mollusques marins est inhibée par les phosphates et sulfates minéraux. Leur élimination, grâce à une précipitation en milieu alcalin par le chlorure de baryum, permet à la sulfatase d'agir. JAYLE et BAULIEU (86) adaptèrent ce principe aux urines en ajoutant 4 g pour 100 ml de $BaCl_2$ (0,2 M) après alcalinisation à pH 11,5 ; le précipité est retenu par filtration sur papier et les urines ramenées à pH 5 avec de l'acide acétique glacial : la précipitation des sels par le chlorure de baryum en milieu alcalin ne provoquant aucune hydrolyse des 17-cétostéroïdes conjugus.

On peut éliminer encore l'influence des sels minéraux en extrayant les stéroïdes conjugus par un solvant comme le butanol à pH 1 ou par un mélange éther-alcool après avoir additionné les urines de 50 p. 100 de sulfate d'ammonium. Les résultats sont tout à fait analogues à ceux obtenus après la précipitation des sels par le chlorure de baryum qui toutefois, est la méthode retenue par JAYLE et BAULIEU à cause de sa plus grande simplicité. Enfin après cette opération, l'hydrolyse par le suc est pratiquée.

SAVARD (130) fut l'un des premiers à étudier la spécificité de la stéroïdesulfatase en travaillant sur des extraits d'Otala punctata ; les auteurs précédents pensaient apparemment que cet enzyme, hydrolysant le déhydroépiandrostéronesulfate, devrait également hydrolyser tous les sulfates stéroïdes connus.

"En dépit du manque d'information au sujet de la spécificité des enzymes envisagés, plusieurs groupes d'auteurs, HENRY et THEVENET (76) ; STITCH et HALKERSTON (154) ; JAYLE et BAULIEU (86) ont récemment montré, comme nous venons de le voir, que l'hydrolyse enzymatique des stéroïdes conjugus urinaires est préférable à l'hydrolyse acide, du fait que ce procédé cause beaucoup moins la destruction des stéroïdes libérés". Mais ROY (127) fait remarquer que ce moyen, pour éviter la destruction des stéroïdes par hydrolyse acide, "pêche lui-même par défaut, du fait de l'hydrolyse incomplète des stéroïdes sulfates due à la spécificité des stéroïdes sulfatases" et ce fait ne semble pas avoir été pris en considération par les auteurs précédents. JAYLE et BAULIEU (86) avaient avancé que dans l'urine normale il existait un 17-cétostéroïde conjugué qui ne devait être ni un sulfate, ni un glucuronide du fait que ce conjugué résiste à l'hydrolyse par le suc digestif d'Helix pomatia qui contient à la fois, d'après HENRY et ses collaborateurs (77), une β glucuronidase et une stéroïdesulfatase.

Depuis, de récents travaux; notamment ceux de SAVARD (130), permettraient plus raisonnablement d'affirmer que ce "conjugué résistant" est l'androstérone sulfate qui est probablement présent dans l'urine normale du mâle d'après VENNING, HOFFMAN et BROWNE (158) et qui n'est pas hydrolysé par les stéroïdes sulfatases de Patella ou d'Otala. Une autre difficulté pour l'usage de la stéroïde sulfatase dans l'hydrolyse des stéroïdes sulfates urinaires est l'inhibition de l'enzyme par beaucoup d'ions présents dans l'urine, mais cette objection est toutefois mineure du fait de la possibilité d'éliminer un certain nombre de ces ions gênants (sulfates et phosphates) par le chlorure de baryum. Par contre le petit nombre de stéroïdes sulfates soumis expérimentalement et isolément jusqu'alors à l'hydrolyse des préparations de stéroïdesulfate employées dans le dosage des stéroïdes sulfates urinaires, constitue une objection très sérieuse contre ce procédé de dosage.

Il semblerait malgré tout que la stéroïdesulfatase puisse jouer un certain rôle dans l'hydrolyse des stéroïdesulfates urinaires, compte tenu de sa haute spécificité.

b)- Stéroïde-sulfatases dans la structure des stéroïdesulfates -

La restriction apportée dans le paragraphe précédent sur l'emploi de la stéroïde sulfatase dans le dosage des stéroïdes urinaires, ne diminue pas sa valeur dans des cas spéciaux : notamment l'enzyme trouve un très grand usage dans la détermination de la structure des stéroïdesulfates isolés, ainsi, pour ne donner qu'un seul exemple, HASLEWOOD (74), montra que la stéroïdesulfatase n'hydrolyse pas le ranolsulfate, ce qui indique que le ranolsulfate n'est probablement pas un 3β sulfate d'un 5α ou d'un $\Delta 5$ stéroïde.

II - ROLE PHYSIOLOGIQUE CHEZ LES MOLLUSQUES.

D'après RÖY (128), la signification physiologique des très grandes quantités de sulfatases dans les tissus des mollusques est actuellement très obscure ; mais il faut se rappeler qu'à la température normale du corps de ces animaux, l'activité de ces enzymes doit être beaucoup moindre que celle déterminée en général dans les conditions de laboratoire : cette dernière étant sans doute 10 fois supérieure, sinon plus, à l'activité physiologique normale. En tenant compte de cette considération, il semblerait que l'activité sulfatasique des tissus des mollusques ne soit pas supérieure à celle des tissus des mammifères à l'état habituel.

Dans le cas de la stéroïdesulfatase et de la glucosulfatase, cependant, l'intérêt réside dans le fait que ces enzymes n'ont pas été détectés jusqu'alors chez les animaux supérieurs. La glucosulfatase et

la chondrosulfatase qui l'accompagne toujours, pourraient entrer dans la digestion des polysaccharidesulfates des algues qui forment pour une large part, la nourriture de nombreux mollusques marins. Malheureusement, Patella vulgata complètement herbivore est comparativement très pauvre en glucosulfatase, DODGSON et SPENCER (42). La stéroïde-sulfatase pourrait être une diastase digestive; puisqu'elle se trouve dans le suc intestinal d'Helix pomatia, mais l'on ne connaît pas de stéroïde sulfate qui soit un constituant normal de la nourriture des Helix ou des mollusques en général. Il en est de même de l'arylsulfatase, enzyme présente dans les sucs digestifs des Helix mais aucun esterphénol ou arylsulfate n'a été détecté dans leur alimentation.

PISCH (55) a récemment montré que les sucs intestinaux de certains mollusques tropicaux contenaient de très grandes quantités d'ions sulfates. Il serait très intéressant de savoir si ces ions sulfates sont produits dans le tube digestif sous l'action des différentes sulfatases sur des constituants alimentaires ou s'ils sont sécrétés tels quels dans le tube digestif. Si la dernière hypothèse était la meilleure, il serait très tentant de supposer que les ions sulfates jouent un rôle fondamental dans le métabolisme de ces animaux.

III - ROLE PHYSIO-PATHOLOGIQUE CHEZ L'HOMME

Un des produits métaboliques des amines aromatiques cancérigènes, l'ester 2-acétamido-6-naphtolsulfurique est hydrolysé par la sulfatase pour donner le 2-acétamido-6-naphtol, mais l'ester 2-amino-1-naphtol sulfurique n'est pas hydrolysé par cette même sulfatase, BOYLAND (16). Ce dernier composé, qui se présente habituellement comme le métabolite le plus abondant du 2-naphtylamine, n'est pas hydrolysé non plus par la sulfatase de l'urine, de la takadiastase ou des bactéries.

Une étude de l'hydrolyse des esters phénolsulfuriques par la sulfatase, effectuée par BOYLAND, MANSON, SIMES et WILLIAMS (17), a démontré que les seuls esters arylsulfuriques qui ne sont pas hydrolysés par les sulfatases étaient les esters de certains orthoamino-phénols.

Aucun des esters aminoarylsulfatasiques ayant un pKa (c'est la constante de dissociation apparente) égal ou supérieur à 4,3 n'est hydrolysé par l'enzyme. Parmi ces derniers, se placent tous les esters dérivés d'amines cancérigènes. BOYLAND (16) pense donc que si une amine aromatique cancérigène est convertie en un ester orthoaminophénylsulfurique, elle sera détoxifiée. Le même auteur met cette hypothèse en parallèle avec les résultats de ELSON et WARREN, d'après lesquels les amines cancérigènes sont excrétées principalement sous forme de glucuronides tandis que les amines non cancérigènes sont excrétées

plutôt sous forme d'esters phénols sulfuriques.

De même la sulfatase ne pourrait pas hydrolyser l'ester 2-amino-1-naphtylsulfurique, ni l'ester 2-amino-1-naphtylsulfurique du glucuronide en 2-aminonaphtol, or ces esters sulfuriques ne s'avèrent pas cancérigènes par la technique BONSER, CLAYSON et JULL (15).

Toujours d'après BOYLAND, les aminophénols cancérigènes sont ordinairement secrétés sous forme conjuguée, donc inerte, mais si l'urine contient des enzymes capables d'hydrolyser ces produits de détoxification, ces enzymes pourraient alors jouer un rôle dans la formation de produits cancérigènes. Pour vérifier cette hypothèse, BOYLAND et WALLACE et WILLIAMS (18) ont mesuré l'activité des enzymes hydrolytiques sulfatases et glucuronidases chez des sujets atteints de cancer de la vessie : 119 sur 121 de ces malades montrèrent des activités glucuronidasiques atteignant sur l'urine des 24 heures, 5,2 unités par ml. d'urine, contre un maximum de 0,6 unité, chiffre fourni par 40 sujets témoins.

Dans la plupart des cas, les urines de ces cancéreux présentent également des activités sulfatasiques plus élevées que les urines normales (dans l'urine normale, le chiffre normal est inférieur à 0,8 unité par ml.), sans toutefois présenter ici des différences aussi frappantes que celles observées avec la glucuronidase.

En définitive, dans le cas du 2-naphtylamine et des autres amines aromatiques capables de produire des tumeurs dans la vessie et au niveau d'autres tissus éloignés du point d'application, BOYLAND (16) pense que l'amine est oxydée dans le foie en un aminophénolcancérigène. Le foie peut rapidement conjuguer la plupart des cancérigènes de cette série avec un sulfate ou un glucuronide de telle sorte que le cancérigène n'est jamais présent en concentration efficace dans cet organe. Les substances conjuguées sont alors excrétées. Puis dans l'urine, des enzymes décomposent glucuronide et sulfate pour ainsi libérer les aminophénols qui, ramenés à l'état libre, peuvent alors provoquer des cancers de la vessie. Or la glucuronidase pourrait être inhibée par la 1-4-saccharolactone. En effet, BOYLAND observe une réduction de l'activité de la glucuronidase urinaire après administration orale de ce produit chez l'homme. Par comparaison, la recherche des inhibiteurs de la sulfatase, présente un intérêt en vue de l'application éventuelle de l'un d'eux comme agent de blocage de la sulfatase urinaire.

BOYLAND (16) a également signalé qu'il se produit dans le métabolisme du tryptophane, des métabolytes naturels ayant une parenté avec les aminophénols cancérigènes, à savoir : l'acide 3-hydroxy-antra-nilique et le 3-hydroxylhymurénine. Ces produits passent également à l'état d'esters sulfuriques et il est probable, bien qu'aucune

communication à ce sujet n'ait été trouvée, que la sulfatase urinaire pourrait jouer à leur égard, le même rôle que vis-à-vis des produits précédents.

DEUXIÈME PARTIE

RECHERCHES EXPERIMENTALES

CHAPITRE I

TECHNIQUE DU DOSAGE DE L'ACTIVITE ENZYMATIQUE

1/- Travaux antérieurs sur la salicylsulfatase -

Dès 1951, notre Maître, Monsieur le Professeur DASTUGUE et son élève FAVIER (34) avaient étudié l'hydrolyse spontanée et enzymatique du salicylsulfate de sodium en présence de sérum humain et de lapin à pH 7,4 en tampon phosphate. Ils concluaient justement dans ces conditions à des résultats négatifs. La question fut reprise quelque temps plus tard dans le même laboratoire par DASTUGUE et BASTIDE (5) et les premiers essais d'étude conduits à pH 7,4 en tampon phosphates M/60 ont abouti au même résultat négatif que ceux observés précédemment. Mais après incubation à 37°, à pH 5,2 et en milieu tampon acéto-acétique M/5, les humeurs et extraits d'organes d'Helix pomatia ont révélé la présence d'une activité salicylsulfatasique très marquée: le suc digestif d'Helix possède une plus forte teneur en enzyme que celles observées pour l'hémolymphe et les différents broyats d'organes d'escargot : c'est ainsi que des dilutions de suc digestif d'Helix 1/90 après des temps d'incubation respectivement d'une demie heure, 1 heure, 2 heures, 3 heures et quatre heures, provoquent dans les conditions indiquées par ces auteurs (5), l'hydrolyse de 25, 39, 56, 70 et 85 p. 100 du substrat mis en présence de ces dilutions de suc, représentant en poids : 40, 60, 86, 106 et 128 mg de salicylsulfate de sodium hydrolysés par gramme de suc digestif ; tandis que pour des temps d'hydrolyse identiques et dans les mêmes conditions expérimentales, l'hémolymphe diluée 1/2 provoquerait seulement l'hydrolyse de 12, 21, 28, 39 et 43 p. 100 du salicylsulfate de sodium introduit dans les mélanges réactionnels, c'est-à-dire exprimés en poids 0,4 , 0,7 , 0,9 , 1,1 et 1,4 mg de substrat hydrolysés par gramme d'hémolymphe d'escargot.

Le sérum humain, d'après ces mêmes auteurs (5), possède une activité salicylsulfatasique trois fois moindre que l'hémolymphe de l'escargot.

De plus, à la suite des travaux publiés sur la phénolsulfatase du suc digestif d'Helix par l'Ecole de CHEYMOL, vis-à-vis du p. nitrophénylsulfate de potassium, BASTIDE (6) a apporté les résultats relatifs au salicylsulfate de sodium et les a étendus à l'hémolymphe et aux extraits des différents organes de ce gastéropode.

II/- Enzyme -

a)- Origine : A la suite des recherches de notre Maître Monsieur le Professeur DASTUGUE et de son élève BASTIDE, nous avons fait appel pour l'étude expérimentale de la salicylsulfatase à l'activité enzymatique du suc hépatopancréatique d'Helix pomatia (L.), ou escargot de Bourgogne qui est la plus grosse espèce du genre. Les escargots sont des mollusques terrestres de la famille des gastéropodes. "L'appareil digestif d'Helix pomatia a été bien étudié par BIERRY et GIASA (10), SELLIER (137), FISCHER (54) et BAYLE (8) : après un bulbe buccal muni d'un manchon et d'une radula, commence l'oesophage sur lequel reposent les glandes salivaires ; il pénètre dans le foie volumineux et y forme des circonvolutions. Les canaux des lobes droit et gauche du foie débouchent dans une dilatation contournée dite estomac ou coecum, qui reçoit le liquide digestif en abondance. On le trouve en quantité appréciable pendant toute l'hibernation ; ses propriétés physicochimiques ont été décrites par DUVAL et FISCHER (49). La durée de l'hibernation est variable suivant les espèces : l'Helix pomatia se réveille en avril".

b)- Prélèvement : Nous prenons des escargots operculés et maintenus à jeun et en vie ralentie dans un réfrigérateur à + 4° . Plusieurs heures avant le prélèvement, nous lavons soigneusement les coquilles à l'eau tiède avant de les essuyer puis nous enlevons l'opercule avec une petite pince à dissection et nous les maintenons quelques temps à + 20° en atmosphère humide, ceci pour mettre fin à l'hibernation et réveiller l'animal. Pour recueillir le suc digestif, nous coupons avec de forts ciseaux deux spires et demie de la coquille et nous nous arrêtons à ce niveau en sectionnant la columelle. L'animal ainsi débarrassé d'une partie de sa coquille est saisi d'une main par son "pied" et de l'autre main par le reste de sa coquille ; par une légère traction on détache le muscle columellaire et le tube digestif apparaît, coloré en rouge brun, sur une partie comprise entre le bulbe buccal et l'hépatopancréas. On le soulève et, à l'aide d'une sonde cannelée, on place une petite pince de Péan le plus près possible de l'extrémité buccale du tube digestif, on la bloque et on sectionne le tube du côté buccal. On place une autre pince de Péan le plus près possible de l'hépatopancréas et on sectionne également. On porte la partie du tube digestif ainsi isolé sur le récipient destiné à recevoir le suc digestif, on enlève la pince mise en dernier lieu, le suc s'écoule. Un escargot donne de II à X gouttes de suc hépatopancréatique et l'obtention des quantités nécessaires aux expériences demande un certain temps.

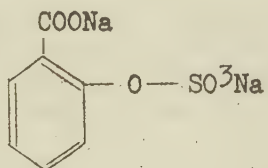
c)- Conservation : Le suc hépatopancréatique ainsi recueilli est centrifugé 5 minutes à 3.000 tours/m. et le centrifugat est conservé à la chambre froide à 0°. Les dilutions nécessaires ne sont faites qu'extemporanément au moment de l'emploi.

III - SUBSTRAT -

a)- Propriétés physiques et chimiques -

Nous avons utilisé dans toutes nos expériences le salicylsulfate de sodium comme substrat. C'est le sel disodique de l'acide sulfurylsalicylique. L'acide sulfurylsalicylique, corps blanc, soluble dans l'eau est l'ester sulfurique de l'acide salicylique. Il résulte théoriquement de l'estérification du groupement phénol de l'acide salicylique par de l'acide sulfurique. C'est de l'aspirine (acide acétylsalicylique), où le groupement acétyl est remplacé par le groupement sulfuryl.

La formule développée du salicylsulfate de sodium est la suivante :



Le salicylsulfate de soude est un corps qui, à l'état pur, se présente sous forme de longues et fines aiguilles microscopiques, stables à l'air, très solubles dans l'eau (75 p. 100 à froid), peu solubles dans l'alcool méthylique, insolubles dans les solvants anhydres usuels.

Sa solution aqueuse ne donne pas de coloration en présence de perchlorure de fer, ce qui s'explique par le blocage de la fonction phénol. En présence d'acide chlorhydrique étendu et à chaud, elle donne rapidement de l'acide salicylique et de l'acide sulfurique.

L'analyse du produit séché à poids constant, à 100° donne p. 100 : LOEPER, COTTET et PARROT (95) :

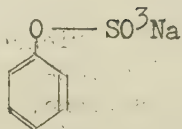
S à l'état d'éther sulfurique	11,98
S total	12,26
Na	17,47
calculé pour 100 de $C^7 H^4 O^6 Na^2$ (salicylate disodé) :	
S	12,23
Na	17,54

Poids moléculaire du salicylsulfate de soude :

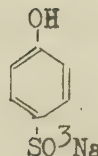
$$C^7 H^4 SO^6 Na^2 = 262$$

Les esters sulfuriques phénols sont des acides phénols sulfuriques ne pouvant exister qu'à l'état de sels, et il importe de ne pas les confondre avec les acides phénols sulfoniques qui sont des dérivés sul-

fonés du phénol :



Phénylsulfate de sodium



Phénolsulfonate de sodium

dans le premier le soufre est fixé à l'oxygène et dans le second, directement à un carbone du noyau.

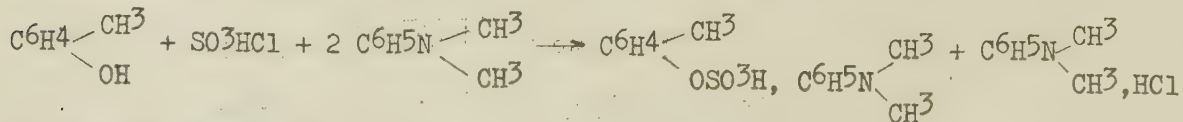
Les phénylsulfates ne donnent plus les réactions des phénols ; ils sont stables en solution aqueuse ou alcaline, tandis que les acides étendus provoquent leur hydrolyse, lentement à froid et très rapidement à chaud, en phénol et acide sulfurique :



réaction qui nous montre que les esters sulfuriques ne peuvent être isolés à l'état d'acides libres, mais de sels neutres.

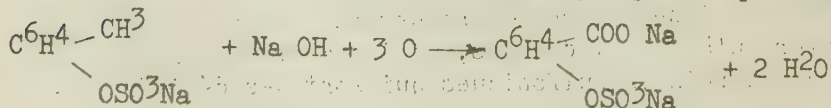
b)- Préparation -

J. PARROD s'est attaché à l'étude de l'ester sulfurique de l'acide salicylique ou acide phényl-1-sulfurique-2-carbonique, ou plutôt de son sel disodique qu'il obtint par la méthode de préparation des esters sulfuriques, la plus pratique en général, à savoir : l'action de la chlorhydrine sulfurique sur un phénol (en l'occurrence, l'acide salicylique) en présence d'une base tertiaire (diméthylaniline-pyridine) ; mais le rendement est faible et il vaut mieux partir de l'orthocrésol. Cette dernière réaction donne le crésylsulfate de la base tertiaire :



qu'on verse alors dans un excès de lessive de soude. La base organique est éliminée par entraînement à la vapeur d'eau, le crésylsulfate cristallise ensuite par évaporation.

On l'oxyde en solution basique par le permanganate de potassium :



c)- Usages thérapeutiques -

Le salicylsulfate de sodium est un médicament dont l'indication majeure est le traitement du R.A.A. Le schéma d'administration du produit est calqué sur celui du salicylate. On peut retenir trois phases :

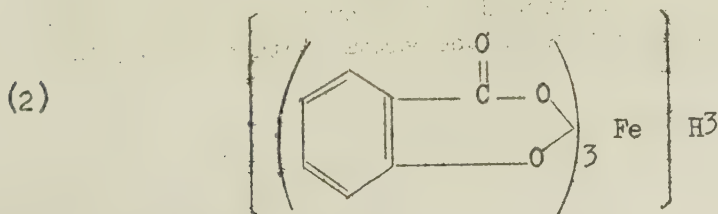
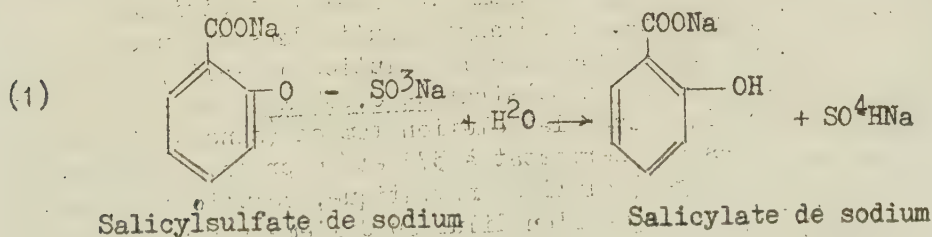
une phase d'attaque, un traitement de consolidation, un traitement d'entretien (138). Les autres indications de la médication par le salicylsulfate de sodium semblent plus restreintes que celles de la médication par le salicylate ; cependant il faut retenir avec intérêt l'emploi du salicylsulfate de sodium pour la prévention des accidents de la salicylothérapie : le salicylsulfate de sodium présentant les mêmes avantages que le salicylate, mais en ayant perdu les inconvénients, en particulier la toxicité (118) tout en conservant un pouvoir thérapeutique suffisamment actif : ce produit devrait probablement permettre, d'après certains cliniciens, d'écarter définitivement les accidents de la salicylothérapie. Les expériences de SEMAULT (138) sur la tolérance tant au point de vue local chez l'animal (oeil de lapin ou de cobaye) que général (rat, cobaye) ont montré une toxicité globale environ 25 fois moins grande que celle du salicylate de sodium.

Le mode d'emploi en thérapeutique du salicylate de sodium et du salicylsulfate de sodium est identique. La voie buccale est, pour les deux produits, le mode d'administration le plus couramment utilisé ; on peut y associer la voie veineuse si l'on veut pratiquer un traitement intensif.

IV - MODE OPERATOIRE -

a)- Principe -

Le salicylsulfate de sodium peut s'hydrolyser en libérant (1) de l'acide sulfurique et du salicylate de sodium dont la fonction phénol donne une belle coloration violette avec le perchlorure de fer : ARNY et RING (3) en 1916 et FONSS-BECH (57) en 1935. Cette coloration serait due à la formule (2) et elle peut être évaluée au photolorimètre.



b)- Réactifs -

1°/- Solution tampon à pH 5,0 CH_3COOH M/5 (soit 12,01 g. p. 1000)
 CH_3COONa M/5 (soit 16,4 g. p. 1000) dans eau distillée
bouillie (à conserver à la glacière).

2°/- Solution de salicylsulfate de sodium 0,01 M dans la solution tampon précédente (2,62 g. par litre) (à préparer extemporanément).

3°/- Solution de ClNa à 9 p. 1000 dans l'eau distillée bouillie.

4°/- Solution de salicylate de sodium 0,01 M (2,62 par litre)
dans la solution chlorurée précédente.

5°/- Solution de perchlorure de fer préparée ainsi qu'il suit :

FeCl_3 , 6 H_2O R.P. à 50 p. 100 20 ml

HCl fumant R.P. 20 ml

6°/- Solution de suc digestif d'Helix pomatia recueilli ainsi
que nous l'avons détaillé, à la dilution convenable (1/10,
1/50, 1/80, 1/100) (à conserver à la glacière).

c)- Technique proprement dite -

1/- Protocole de l'hydrolyse : La technique suivie est celle que
BASTIDE (7) a utilisée dans sa thèse et qui peut se résumer ainsi :

On maintient au thermostat à 37° pendant 10 minutes, trois tubes renfermant, le premier : 1, 2 ou 5 ml. de solution enzymatique ; le second, la solution de salicylsulfate de sodium 0,01 M et le troisième la solution tampon sans salicylsulfate. On mélange ensuite dans un tube à parties égales, la solution enzymatique avec la solution de salicylsulfate réalisant ainsi une dilution finale en substrat de 0,005 M et dans un autre tube, la solution enzymatique avec la solution tampon (sans salicylsulfate). On porte les deux tubes au thermostat à 37° et on prélève à intervalles réguliers 2 ml. de mélange (solution enzymatique, solution de salicylsulfate) en cours d'hydrolyse, que l'on dilue au dixième par addition de 18 ml. de sérum physiologique. On apprécie ensuite l'hydrolyse en comparant la coloration obtenue après addition de deux gouttes de la solution de perchlorure de fer avec celle des tubes d'une gamme d'étalon en salicylate de sodium.

2/- Etalonnage : La gamme étalon est obtenue en ajoutant dans une série de tubes calibrés (jaugés à 20 ml.) des quantités croissantes de la solution de salicylate 0,01 M (soit 0 - 0,1 - 0,2 - 0,3 - 0,4 - 0,50,9 - 1 ml.) qui correspondent respectivement à une hydrolyse de (0 - 10 - 20 - 30 - 40 - 50 - ... 90 - 100 p. 100) avec du sérum physiologique. On ajoute au moment du dosage 2 ml. de sérum dilué au demi par le milieu tampon et ayant séjourné au thermostat pendant un intervalle de temps identique à celui de la prise d'essai.

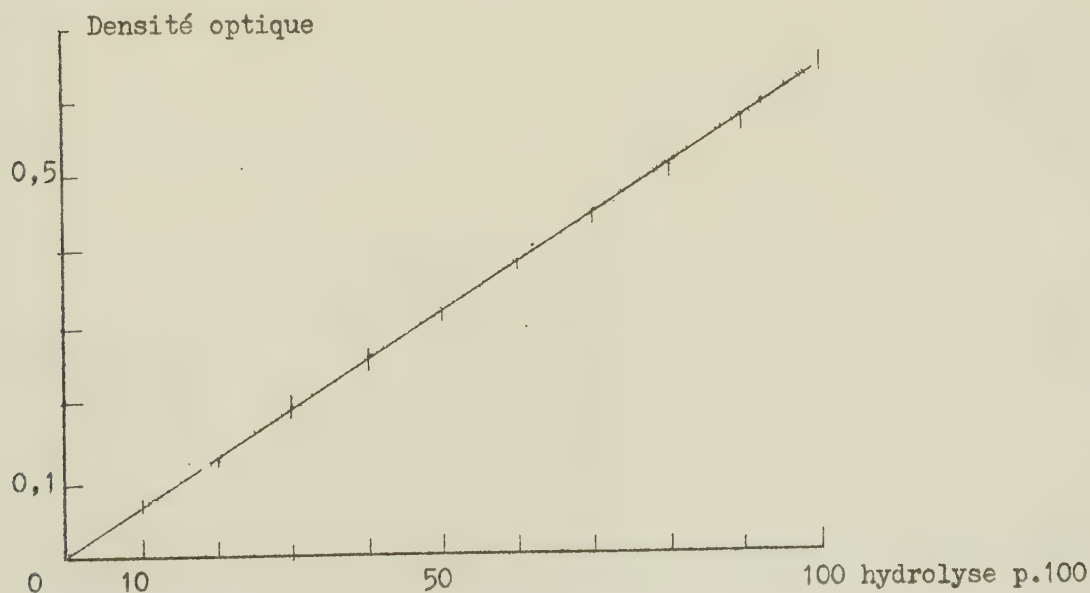
Les lectures sont effectuées au photocolorimètre électrosynthèse (type S.T.D.) en lumière verte (filtre n° 4). Les solutions étant examinées sous une épaisseur de 9 millimètres dans une cuve de quartz.

L'étalonnage figure dans le tableau n° 1 et la courbe n° 1 .

TABEAU n° 1 -

Salicylate Na 0,01 M	0	0,1	0,2	0,3	0,4	0,5	0,6	0,7	0,8	0,9	1
Déviatiou du galvanomètre	100	88	76	66	56	48	41	35	30	26	22
Densité optique	0	0,06	0,12	0,18	0,25	0,32	0,38	0,44	0,50	0,56	0,64
Hydrolyse p. 100	0	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100

COURBE n° 1 -



La coloration suit la loi de LAMBERT et BEER dans les limites que nous utilisons et nous paraît très convenable pour effectuer un dosage colorimétrique nous permettant d'apprécier les modalités de l'hydrolyse enzymatique du salicylsulfate de sodium.

CHAPITRE II

INFLUENCE DE L'ACIDITE IONIQUE ET DE LA NATURE DU MILIEU TAMPON

Nous avons suivi le cours de l'hydrolyse enzymatique du salicylsulfate de sodium au thermostat à 37°,5 au contact du suc digestif d'Helix pomatia à la dilution de 1/80 en présence de milieux tampons de nature et de pH variés :

- acétate de sodium - acide acétique, selon les indications de KOLTHOFF (90).
- borax - acide succinique, d'après KOLTHOFF.
- phosphate monopotassique - phosphate disodique, d'après SORENSEN
- phosphate disodique - acide citrique, d'après Mc ILVAINE.
- barbital sodique - acide chlorhydrique, d'après MICHAELIS.

La technique employée a été décrite au chapitre précédent avec un milieu tampon acétique et à pH 5,0 ; les seules modifications envisagées dans ce chapitre concernent la nature du milieu tampon et la valeur des différents pH correspondants, toutes autres conditions restant égales, à savoir : la concentration du substrat (0,01 M au départ et 0,005 après addition du suc digestif), la température d'incubation 37°,5, la coloration au perchlorure de fer, les temps d'hydrolyse : $\frac{1}{2}$ h. - 1 h. - 2 h. - 3 h. - et 4 h. (et éventuellement davantage). De plus, une gamme étalon a été refaite pour chaque valeur de pH et chaque nature de solution tampon pour éliminer les erreurs dues aux variations de la réaction colorée dans ces conditions particulières.

I - Solution tampon acéto-acétique -

Les hydrolyses sont effectuées en utilisant des milieux tampons acétiques M/5 de pH variant de 3,5 à 6,3 préparés par mélange d'une solution d'acide acétique M/5 et d'une solution d'acétate de sodium M/5 dans les proportions indiquées dans le tableau n° 2 (page suivante).

Tous les pH sont contrôlés à l'électrode de verre.

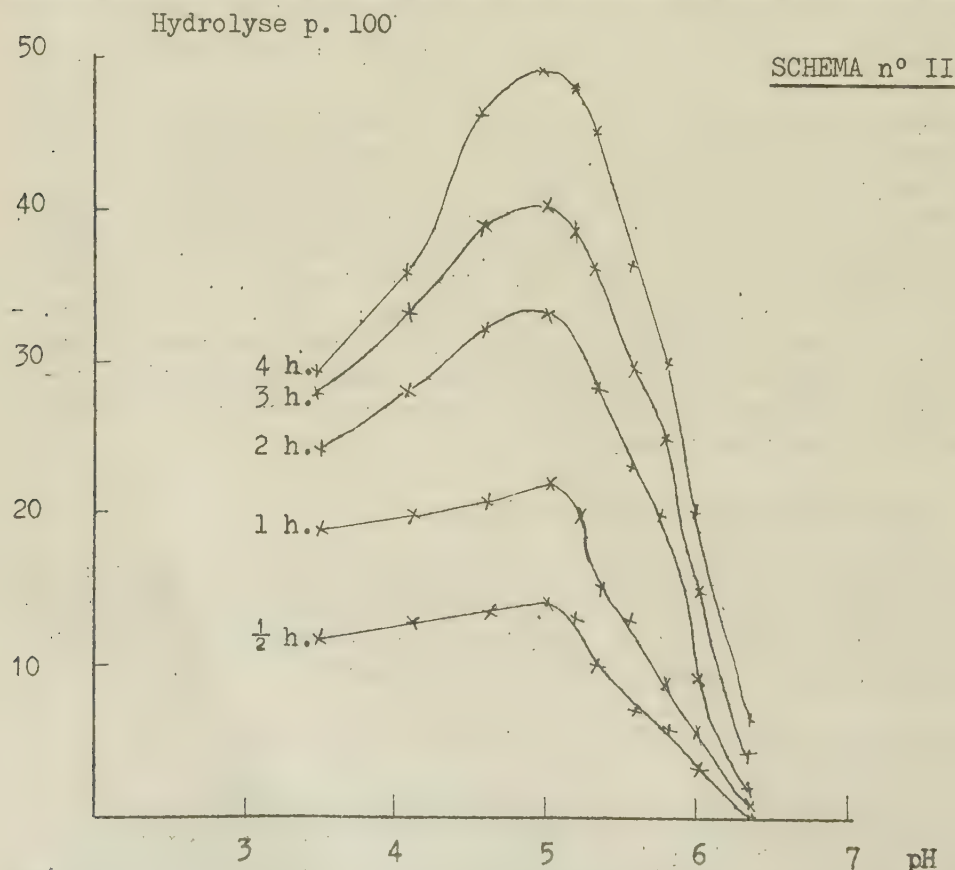
Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 3 où figurent pour chaque valeur du pH, les taux correspondants à l'hydrolyse du salicylsulfate de sodium exprimés en pourcentage de substrat hydrolysé.

TABLEAU n° 2 -

pH des solutions tampons	3,5	4,1	4,6	5,0	5,2	5,3	5,6	5,8	6,0	6,3
ml. de solution acide acétique M/5	95	82	60	30	22	20	11	8	5	2
ml. de solution acétate de Na M/5	5	18	40	70	78	80	89	92	95	98

TABLEAU n° 3 -

pH du milieu acétate ou du mélange réactionnel		3,5	4,1	4,6	5,0	5,2	5,3	5,6	5,8	6,0	6,3
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	12	13	13,5	14	13	10	7	6	3	0,2
	1 h.	19	20	21	22	21	15	13	9	5	0,8
	2 h.	24	28	32	33	32	28	23	20	9	2
	3 h.	28	33	39	40	39	36	29	25	15	4
	4 h.	29	38	46	49	48	45	36	30	20	7



Variations de l'activité salicylsulfatasique en fonction du pH et du temps en tampon acétate.

Ils sont relatifs à une dilution de suc digestif au 1/80 . Enfin le schéma II rend ces résultats plus explicites et fait apparaître dans ces conditions expérimentales un net optimum d'activité aux environs de pH 5,0 .

II - Solution tampon borax-acide succinique.

Les solutions tampons sont obtenues par mélange d'une solution de borax ($B^4O_7Na^2$, 10 H^2O) 0,05 M et d'une solution d'acide succinique ($COOH - CH^2 - CH^2 - COOH$) 0,05 M dans les proportions indiquées dans le tableau n° 4.

Préparation de la solution de borax 0,05 M = sol. A :

- borax R.P. 19,1 g.
- eau q.s.p. 1.000 ml.

Préparation de la solution d'acide succinique 0,05 M = sol. B :

- acide succinique R.P. 5,9 g.
- eau q.s.p. 1.000 ml

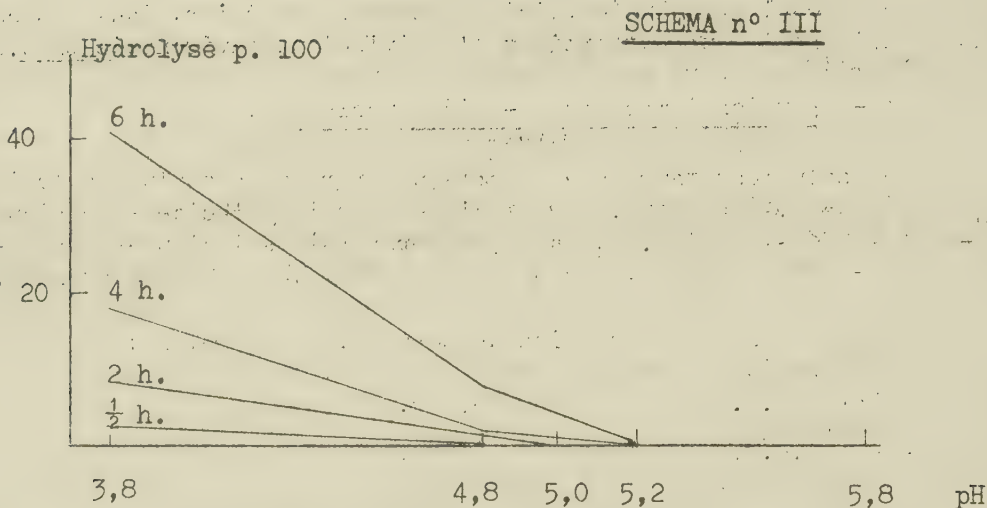
TABLEAU n° 4 -

pH des solutions tampons	3,8	4,8	5,0	5,2	5,8
ml. de solution de borax	13,2	34,0	37,5	40,0	46,5
ml. de solution d'acide succinique	86,8	66,0	62,5	60,0	53,5

Nous obtenons ainsi une gamme de milieux tampons variant de pH 3,8 à 5,8, contrôlés électrométriquement comme toujours. Les résultats, exprimés comme précédemment figurent dans le tableau n° 5. Nous avons vérifié que ces milieux tampons n'ont aucune influence sur la réaction colorée de l'acide salicylique libéré par le perchlorure de fer, ce qui nous permet d'utiliser la gamme étalon établie au chapitre I pour convertir les déviations obtenues au photocolorimètre en pourcentage d'hydrolyse.

TABLEAU n° 5 -

pH du milieu tampon ou du mélange réactionnel	3,8	4,8	5,0	5,2	5,8
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	2,5	1	0	0
	2 h.	8,5	1,5	0	0
	4 h.	18	2	0,5	0
	6 h.	41	8	4	0,5



- Influence du pH en tampon borax-acide succinique sur l'activité salicylsulfatase du suc digestif d'*Helix*.

Un examen superficiel du tableau n° 5 et des courbes qui en sont la traduction, pourrait faire croire que nous avons abouti à des résultats opposés à ceux obtenus en milieu acéto-acétique et qu'en milieu borax-acide succinique l'activité est d'autant plus grande que le pH est plus faible, tout au moins jusqu'à la valeur de 3,8.

L'interprétation réelle est toute différente. Le borate de soude comme nous le verrons plus loin aux chapitres des effecteurs, est inhibiteur par lui-même, indépendamment de la réaction alcaline qu'il est susceptible de communiquer à ses solutions. Si bien que l'activité augmente à mesure que le pH baisse, non pas dans la zone considérée, parce que l'acidité augmente, mais parce que la concentration en borax diminue.

III - Solution tampon phosphates -

Nous utilisons au départ des mélanges de solutions de phosphate mono-potassique M/30 et de phosphate disodique M/30 de pH variant de 5,0 à 8,1. En somme, nous nous servons de la gamme de milieux tampons phosphates de SOERENSEN, mais au lieu de M/15, nous prenons une concentration molaire M/30.

- Préparation de la solution phosphate mono-sodique M/30 = Sol. A :

- KH_2PO_4 9,078 g.
- eau distillée bouillie q.s.p. 2.000 ml.

- Préparation de la solution de phosphate disodique M/30 = Sol. B :

- Na_2HPO_4 , 2 H_2O 11,876 g.

- eau distillée bouillie q.s.p. 2.000 ml.

TABLEAU n° 6 -

pH des solutions tampons	5,0	5,2	5,4	5,9	6,2	8,1
ml. de sol. A	98,5	97	96	88	37	3,3
ml. de sol. B	1,5	3	4	12	63	96,7

Les pH sont contrôlés, comme toujours, à l'électrode de verre d'une part, et il est à remarquer que cette concentration suffit pour tamponner nos dilutions de suc digestif 1/80 . Des gammes étalons ont été faites pour ces six solutions tampons en opérant de la même façon que dans le Chapitre Premier pour la gamme étalon avec le tampon acéto-acétique à pH 5,0 : les gammes à l'électrophotomètre pour les pH 5,0 - 5,2 et 5,9 en tampon phosphates sont identiques à celle en tampon acétate à pH 5,0, mais la gamme à pH 6,2 et surtout celle à pH 8,1 sont très légèrement différentes et, pour convertir les lectures faites à ces pH en taux d'hydrolyse, nous nous reporterons à ces nouvelles gammes.

Les taux d'hydrolyse ainsi obtenus sont très faibles quels que soient le pH et la durée de séjour au thermostat (Tableau n° 7).

Il y a une double raison à cela :

- d'une part, parce que nous savons déjà par les résultats obtenus en milieu acéto-acétique que pour des pH supérieurs à 5,2 la décroissance de l'activité enzymatique est extrêmement rapide.
- d'autre part, parce que les phosphates ont par eux-mêmes, une action inhibitrice que nous retrouverons à l'état pur dans l'un des chapitres consacrés aux effecteurs.

TABLEAU n° 7 -

pH du milieu phosphates ou du mélange réactionnel		5,0	5,2	5,4	5,9	6,2	8,1
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	0	0	0	0	0	0
	2 h.	2	2	1	0	0	0
	4 h.	3,5	3,5	3	0,5	0	0
	8 h.	9	8	8	5	2	0
	11 h.	12	11	9	7	4	1

IV - Solution tampon citrate-phosphate -

Les solutions de pH allant de 2,4 à 6,9 proviennent du mélange d'une solution de phosphate disodique 0,2 M et d'une solution d'acide citrique 0,1 M dans les proportions indiquées par le tableau n° 8.

- Solution de phosphate disodique 0,2 M = Sol. A :

- Na_2HPO_4 , 2 H_2O 35,6 g.
- eau distillée bouillie q.s.p. 1.000 ml.

- Solution d'acide citrique 0,1 M = Sol. B :

- $\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$, H_2O 21,01 g.
- eau distillée bouillie q.s.p. 1.000 ml.

TABLEAU n° 8 -

pH des solutions tampons	2,4	3,0	3,6	4,0	5,0	6,9
ml. de sol. A	6	28	44	52	66	87
ml. de sol. B	94	72	56	48	34	13

Le pH de chaque mélange a été vérifié à l'électrode de verre. Comme toujours des gammes étalons ont été faites pour toutes ces solutions tampons, selon la technique employée dans le paragraphe IV du premier chapitre.

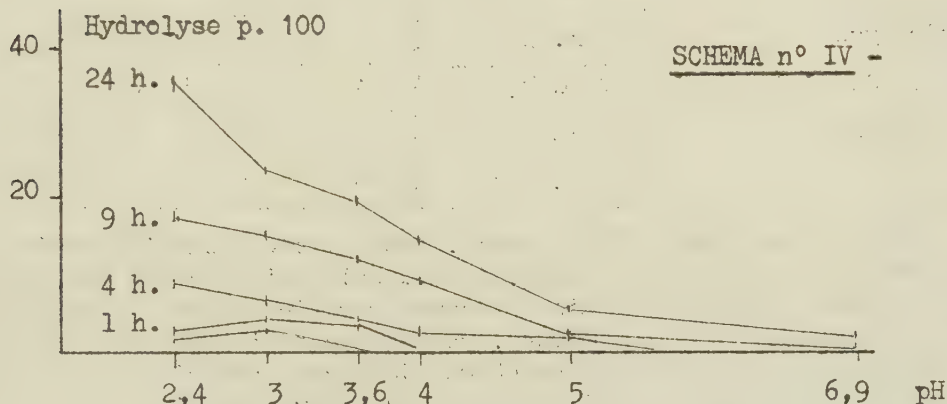
Nous n'avons obtenu que des hydrolyses relativement faibles (tableau n° 9) et qui s'expliquent une fois encore par la mise en jeu des deux facteurs précisément étudiés dans ce chapitre, à savoir la valeur du pH et la nature du milieu tampon:

en ce qui concerne l'acidité ionique, nous sommes précisément au dessous de 5,0, dans une zone où l'activité est d'autant moindre que l'activité est plus grande ;

en ce qui concerne la nature du milieu tampon nous retrouvons le rôle inhibiteur des phosphates déjà signalé et sur lequel nous reviendrons alors que les citrates, comme nous le montrerons plus tard, tout au moins à la dilution maxima employée ici (3,5 p. 100) n'ont aucune action inhibitrice appréciable.

TABLEAU n° 9 -

pH du milieu tampon ou du mélange réactionnel		2,4	3,0	3,6	4,0	5,0	6,9
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	1	2,5	2	0,5	0,5	0
	1 h.	2	3,5	3,5	1	1	0
	4 h.	8	6,5	4	1,5	1,5	0
	9 h.	17	15	12	9	2	0
	24 h.	36	24	20	14	5	1



- Influence du pH en milieu citrate-phosphate

V - Solution tampon barbital-acide chlorhydrique -

Les solutions tampons de pH 6,8 à 9,2 proviennent du mélange d'une solution de barbital sodique 0,1 M et d'une solution d'acide chlorhydrique 0,1 N dans les proportions indiquées dans le tableau n° 10. La solution de barbital sodique contient 20,62 g. de barbital sodique par litre.

Il est à noter que ces six milieux tampons n'apportent aucune coloration spéciale avec le perchlorure de fer et ne modifient nullement l'apparition de la coloration violette : aussi la gamme étalon du chapitre premier servira encore à traduire en pourcentage d'hydrolyse les déviations lues au photocolorimètre pour ces expériences.

TABLEAU n° 10 -

pH des solutions tampons .	6,8	6,9	7,3	8,2	8,7	9,2
ml. de sol. de barbital	52,2	52,9	55,4	71,6	87,1	95,2
ml. de sol. HCl 0,1 N	47,8	47,1	44,6	28,4	12,9	4,8

TABLEAU n° 11 -

pH du milieu barbital ou du mélange réactionnel		6,8	7,3	8,2	8,7	9,2
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	0	0	0	0	0
	1 h.	0	0	0	0	0
	4 h.	3	1	0	0	0
	7 h.	4	2	0	0	0
	18 h.	13	3	0	0	0

Dans ce cas particulier encore, nous trouvons une inhibition extrêmement notable de l'activité enzymatique. Mais ici la constitution des milieux tampons ne serait être mise en cause car l'étude des effecteurs nous montrera que le barbital sodique, pas plus que l'acide chlorhydrique, aux concentrations ici employées ne gênent de façon appréciable l'activité de la salicylsulfatase. Il convient donc de conclure que l'inhibition ainsi constatée est due uniquement aux valeurs très élevées du pH.

VI - Sans solution tampon -

Dans une sixième série d'expériences, nous n'avons pas tamponné le mélange réactionnel, mais simplement ajouté à la dilution de S.D.H. une solution aqueuse de salicylsulfate (0,01 M) préparée avec de l'eau distillée bouillie. Le pH a été noté pour chaque tube avant et après incubation et les résultats figurent au tableau n° 12, (page suivante).

L'examen du tableau n° 12 montre avant tout des résultats anarchiques auxquels d'ailleurs on pouvait s'attendre a priori, puisqu'il s'agit d'un milieu non tamponné (ou très peu, vu la forte dilution du S.D.H. lui-même tamponné). Néanmoins, en considérant les moyennes des résultats, on peut se représenter ainsi l'évolution des phénomènes :

Au début, le pH du milieu réactionnel varie de 5,5 à 5,7, il est donc un peu au-delà de l'optimum que nous avons précédemment fixé à 5,0 et

TABLEAU n° 12 -

Temps d'incubation	$\frac{1}{2}$ h.	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.	6 h.
Hydrolyse p. 100	2	27	10	8	7	54	59
pH final du mélange réactionnel	5,5	5,0	5,3	5,4	5,4	4,6	4,5
Hydrolyse p. 100	17	6	32	18	9	21	41
pH final	5,4	5,6	4,9	5,3	5,2	5,1	4,6
Hydrolyse p. 100	4	4	21	38	60	32	60
pH final	5,6	5,5	5,1	4,7	4,5	4,9	4,5
Hydrolyse p. 100	8	5	35	21	54	38	49
pH final	5,5	5,6	4,8	5,0	4,6	4,6	4,6
Taux moyen d'hydrolyse	8	10	25	21	32	36	52
pH final moyen	5,5	5,4	5,0	5,1	4,9	4,8	4,5

nous comprenons fort bien la lenteur de l'hydrolyse dans les premiers temps. Puis au fur et à mesure que le substrat libère du SO_4HNa , le milieu s'acidifie et le pH devient plus favorable ; mais arrive un moment où cette acidité est trop grande et où le pH atteint 4,5 - 4,6 et se trouve non plus au delà, mais en deçà de la valeur optima de l'acidité ionique. Ainsi les conditions optima (de pH) ne persistent que pendant un certain temps, ce qui explique qu'en définitive le pourcentage d'hydrolyse soit inférieur à celui obtenu pendant des temps d'incubation identiques pour le pH optimum en milieu tampon.

Malgré tout, les résultats obtenus viennent souligner, d'une part par leur insuffisance et plus encore par leur irrégularité, la nécessité bien connue en enzymologie de travailler strictement en milieu tamponné. Et c'est ainsi que dans la poursuite de nos essais nous nous sommes toujours placé en milieu rigoureusement tamponné tant pour obtenir le rendement le meilleur que pour assurer le plus de régularité possible dans la vitesse de la réaction d'hydrolyse.

En ce qui concerne l'influence de la nature du milieu tampon, nos résultats font ressortir un maximum d'activité en milieu acéto-acétique et des activités de plus en plus réduites au fur et à mesure que l'on passe aux milieux : borax-acide succinique, phosphate-citrate, phosphates et barbital-acide chlorhydrique.

Enfin les résultats consignés dans le tableau n° 13 montrent un plus grand pouvoir inhibiteur des tampons phosphates, citrate-phosphate et

borax-acide succinique vis-à-vis de la "salicylsulfatase" du S.D.H. que vis-à-vis de la "p. nitrophénylsulfatase" du S.D.H. étudiée par JARRIGE et HENRY (85) ; en effet, ces derniers auteurs constatèrent une inhibition seulement de l'ordre de 12 p. 100 pour le tampon citrate, de 48 p. 100 pour le tampon phosphates et de 77 p. 100 pour le tampon citrate-phosphate.

TABLEAU n° 13 -

Tampon	Acétate 0,1 M	Phosphates M/30	Citrate- phosphate	Borax-acide succinique
Hydrolyse p. 100 en 4 h.	49 %	3,5	1,5 %	0,5 %
mg. de substrat hydrolés par g. S. D. H.	103	7	3	1,5
Inhibition	0/100	92,8/100	96,9/100	99/100

CHAPITRE III

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION DU MILIEU TAMPON ACETO-ACETIQUE

On réalise dans les 2 ml. de mélange mis au thermostat à 37°,5 pendant les temps adoptés généralement de $\frac{1}{2}$ heure, 1 h. , 2 h. , 3 h. et 4 h. des concentrations en tampon acétate (de pH 5,0) allant de 0,01 M à 1 M. A cet effet, nous préparons des solutions tampons de concentrations comprises entre 0,02 M et 2 M (l'addition de la préparation aqueuse enzymatique ramenant à la concentration finale désirée).

Préparation d'une solution tampon acéto-acétique 2 M :

- Dans un ballon de 1 litre, on introduit :

- acétate de sodium	190,5 g.
- acide acétique	36,0 g.
- salicylsulfate de sodium	2,62 g.
- eau distillée bouillie q.s.p.	1.000 ml.

Préparation des solutions tampons acéto-acétiques de concentrations inférieures à 2 M :

- nous réalisons les mélanges (indiqués dans le tableau 14) de la solution tampon 2 M et d'une solution aqueuse sans tampon contenant toutes les deux 2,62 g. de salicylsulfate de sodium par litre. Les pH de tous ces tampons pris à l'électrode de verre sont tous égaux à 5,0 ; de plus, le pH du mélange (1ml S.D.H. + 1ml tampon) est dans chaque tube égal à 5,0, mais avec la concentration 0,02 M, nous sommes à l'extrême limite pour obtenir un effet tampon correct. Nous avons refait des gammes étalons pour ces huit concentrations, or, il s'est trouvé que toutes ces gammes sont identiques à la seule condition de modifier le nombre de gouttes de perchlorure de fer ajoutées dans chaque tube avant passage au photolorimètre, comme nous l'avons signalé dans le premier chapitre.

- Toujours II gouttes de Fe Cl_3 pour les concentrations 0,25 M, 0,1 M, 0,05 M et 0,01 M.
- mais III gouttes de Fe Cl_3 pour les concentrations 0,5 M et 0,6 M.
- IV gouttes de Fe Cl_3 pour la concentration 0,8 M.
- et enfin VIII gouttes de Fe Cl_3 pour la concentration 1 M.

Il y a lieu de faire un témoin pour chaque lecture.

TABLEAU n° 14 -

Concentrations des solutions tampons	2 M	1,6 M	1,2 M	1 M	0,5 M	0,2 M	0,1 M	0,02 M
ml. de tampons 2 M salicylé	100	80	60	50	25	10	5	1
ml. de solution aqueuse salicylée	0	20	40	50	75	90	95	99

Les résultats obtenus figurent dans le tableau n° 15 et ont servi à établir les courbes du schéma V.

TABLEAU n° 15 -

Concentration finale du tampon		1 M	0,8 M	0,6 M	0,5 M	0,25 M	0,1 M	0,05 M	0,01 M
Hydrolyse enzymatique p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	6	7	8	9,5	11,5	11,5	11	9,5
	1 h.	12	13	15	19	21	21	21	19,3
	2 h.	21,5	23	28	30,5	32	32,5	32	31
	3 h.	28	34	37	38	41	41	41	40
	4 h.	34	39	42	43	46	46	45	44
	5 h.	38	43	45	47	49	49	49	48

Discussion et interprétation -

De l'examen des résultats consignés dans le tableau 15 ci-dessus et des courbes du schéma V (page suivante), nous voyons qu'à égalité de pH (on se place au pH optimum de 5,0) la concentration du tampon acétate a une certaine influence sur l'activité de la "salicylsulfatase".

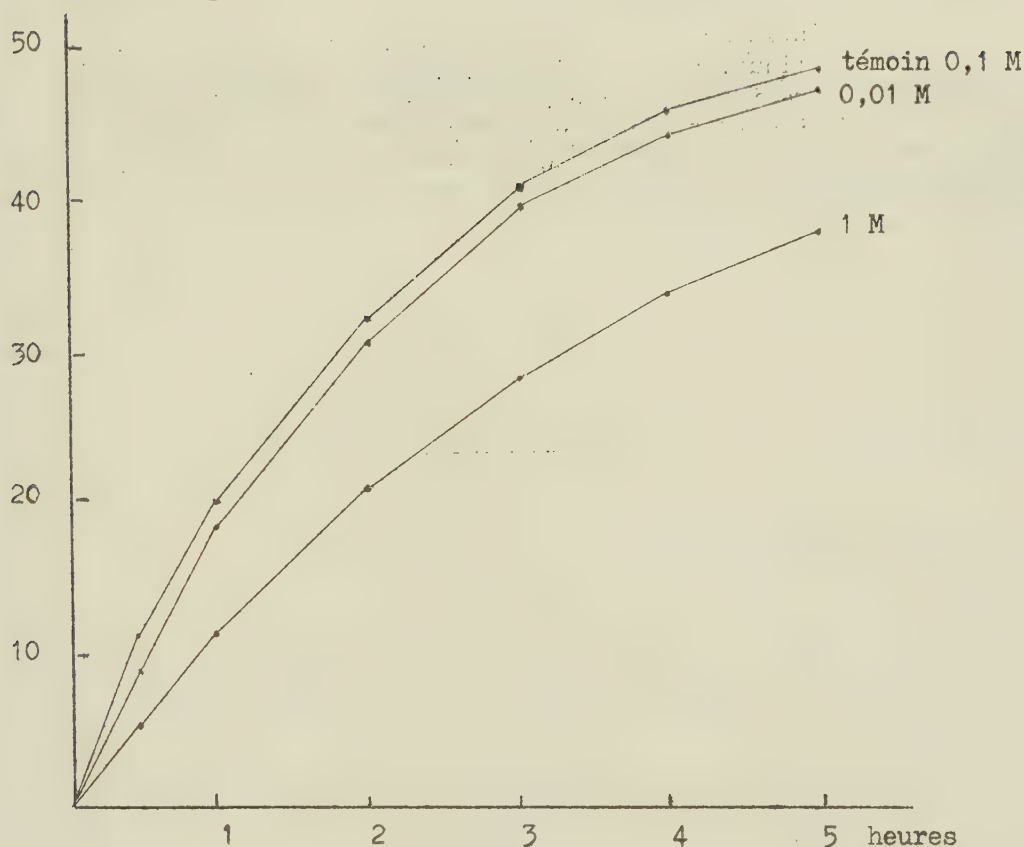
Si l'on peut confondre les résultats pour les concentrations 0,05 M, 0,1 M, 0,25 M, voir même 0,5 M, il faut bien reconnaître une certaine inhibition pour celles comprises entre 0,5 M et 0,8 M ; enfin, pour une dilution finale en tampon acétate 1 M, l'inhibition devient encore plus prononcée.

Ces résultats sont à confronter avec ceux obtenus par HENRY et ses collaborateurs (77) qui ne constatèrent aucune influence de la concentration du tampon acétate (de 0,025 M à 1,8 M) sur l'hydrolyse du p. nitrophénolsulfate par le suc digestif d'*Helix pomatia* au cours d'hydrolyses poursuivies pendant une heure.

Ces résultats nous ont engagé à continuer nos expériences en

SCHEMA n° V -

Hydrolyse p. 100



Influence de la concentration du milieu tampon acéto-acétique à pH 5,0

tampon acétate 0,1 M en général, réservant l'emploi de tampons 0,25 M ou 0,5 M quand l'addition d'un effecteur à des concentrations élevées, mais intéressantes à étudier, perturbe par trop le pH. Quelque soit notre intérêt à maintenir le pH au voisinage de 5,0, nous nous sommes pourtant toujours refusé à utiliser une concentration en tampon acétate 1 M, moins par suite de l'obligation d'ajouter VIII gouttes de Fe Cl_3 , mais surtout à cause de l'inhibition constatée à cette concentration et plus encore des possibilités d'interférence avec un effecteur déjà inhibiteur par lui-même. En effet, nous avons constaté que si, pour telle substance qui, à une concentration déterminée, possède une influence inhibitrice, mais cela à un pH défavorable (inférieur à 4,5 ou supérieur à 5,4), nous cherchions à ramener ce pH aux alentours de 5,0 en remplaçant le tampon 0,2 M ou 0,5 M par un tampon 2 M, loin d'obtenir une inhibition moins forte (comme il aurait été logique de s'y attendre) nous observions des taux d'hydrolyses bien plus faibles que ceux établis en tampon 0,1 ou 0,25 M à un pH même défavorable.

CONCLUSION -

L'étude de l'influence de la concentration du tampon montre, pour le milieu acéto-acétique, au pH optimum 5,0, un maximum d'activité enzymatique à la concentration 0,1 M ; concentration qui a elle-même un effet tampon généralement suffisant et que, sauf cas particuliers mentionnés, nous emploierons de façon systématique pour la suite de nos expériences.

CHAPITRE IV

INFLUENCE DE LA TEMPERATURE

Après avoir déterminé le pH optimum avec la solution tampon la plus propice, à la concentration optima (pH = 5,0 tampon acéto-acétique M/5), nous avons examiné l'action de la température sur l'hydrolyse spontanée et enzymatique du salicylsulfate de sodium et ceci de deux manières différentes :

1°/- étude de l'hydrolyse effectuée au thermostat à des températures comprises entre + 4° C et 67° C ;

2°/- étude de l'hydrolyse effectuée à 37° C, avec des solutions enzymatiques préalablement portées 30 minutes à des températures allant de + 23° C à 72° C.

I/- Hydrolyses effectuées à des températures différentes

Nous utilisons un thermostat "THERMOMIX" (Braun, Melsungen), muni d'une pompe qui donne avec une précision de + ou - 0°,25 des bains thermostatiques allant de la température ambiante à + 100° C. Une série d'hydrolyses a été effectuée à la chambre froide à + 4° C, une autre à la température du laboratoire à + 23° C.

Les résultats ainsi obtenus en milieu tampon acéto-acétique de pH 5,0 avec un suc digestif d'Helix dilué au 1/50 figurent dans le tableau n° 16. Ils sont exprimés en pourcentage de substrat hydrolysé et sont relatifs à l'hydrolyse totale et à l'hydrolyse spontanée. L'hydrolyse enzymatique pure a été obtenue par différence entre les deux précédentes.

Nous avons vérifié d'autre part, qu'à 0° C l'hydrolyse se poursuit encore et atteint au bout de 12 heures, le chiffre de 4 p. 100.

On voit donc tout d'abord à la lecture du tableau VI (page suivante), et ce point à une importance capitale, que si l'hydrolyse du salicylsulfate de sodium sans suc digestif d'Helix ne se manifeste pratiquement pas pour des températures inférieures à 47° et des temps d'incubation ne dépassant pas 4 heures, il s'en produit une de plus en plus forte quand la température s'élève au-dessus de 47°. Dans ce chapitre consacré à l'étude systématique de la température et, envisageant par conséquent des températures supérieures à 47°, il nous a donc été nécessaire d'en tenir compte et de soustraire l'hydrolyse que nous qualifierons de "spontanée" de l'hydrolyse totale de manière à chiffrer l'activité enzymatique à l'état pur. Mais dans la suite de nos expériences et en particulier au cours de nos recherches sur les effecteurs et déjà en ce qui concerne le préchauffage envisagé dans la deuxième moitié de ce chapitre, les expériences ayant été menées toujours à la température de 37° et au cours

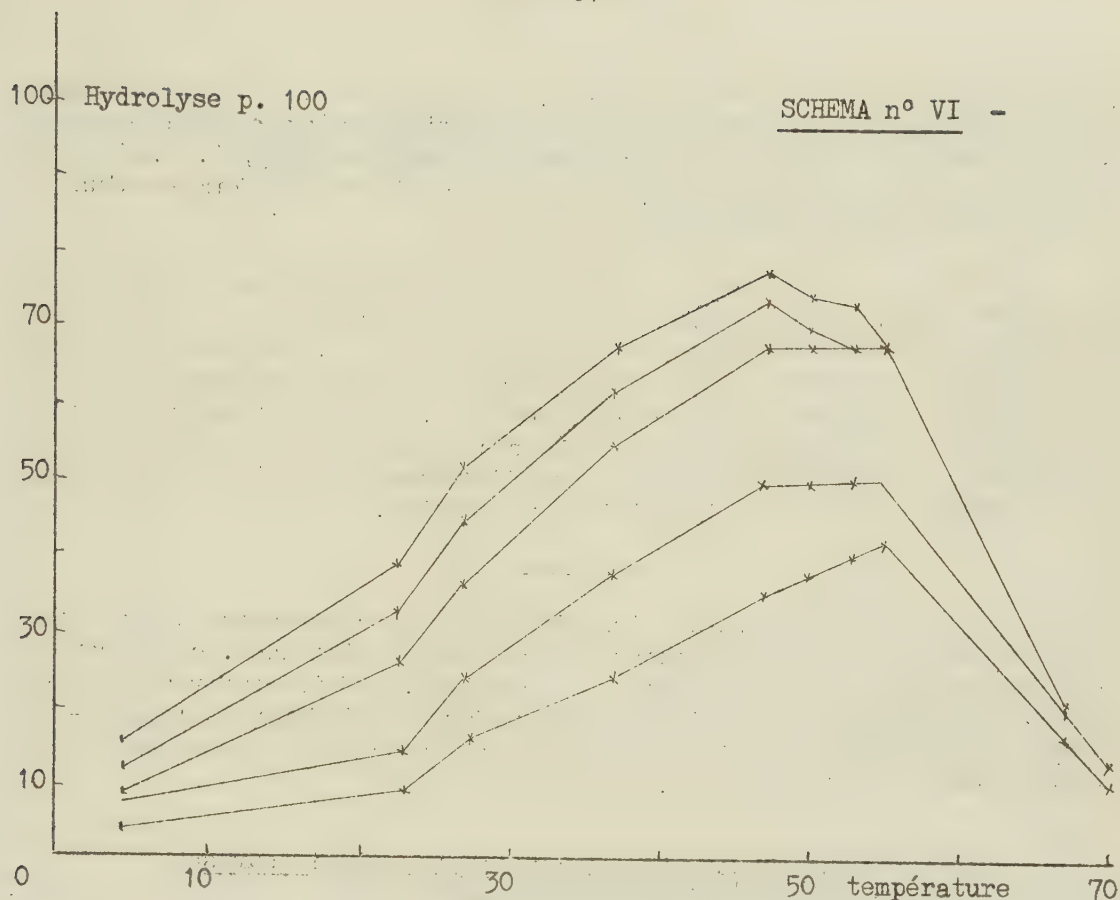
TABEAU n° 16 -

Temps d'in- cub.	Nature de l'hydrolyse	Pourcentage d'hydrolyse à la température d'incubation de									
		4°	23°	27°	37°	47°	50°	53°	55°	67°	70°
$\frac{1}{2}$ h.	Totale	4,5	8,5	16	24	35,4	38,5	40,5	42,7	18	15,5
	Spontanée	-	-	-	-	0,4	0,5	0,5	0,7	2	4,5
	Enzymatique	4,5	8,5	16	24	35	38	40	42	16	11
1 h.	Totale	7,5	14	24	38	50,7	51	51	51,5	23,5	-
	Spontanée	-	-	-	-	0,7	1	1	1,5	4,5	-
	Enzymatique	7,5	14	24	38	50	50	50	50	19	-
2 h.	Totale	9	26	36	55	69,2	69,5	70	71,5	36,5	-
	Spontanée	-	-	-	-	1,2	1,5	2	3,5	16,5	-
	Enzymatique	9	26	36	55	68	68	68	68	20	-
3 h.	Totale	12,5	33	45	62	76,5	73	72,5	73	44	-
	Spontanée	-	-	-	-	2,5	3	4,5	5	24	-
	Enzymatique	12,5	33	45	62	74	70	68	68	20	-
4 h.	Totale	16	39	52	68	83	81	80,5	77	50	-
	Spontanée	-	-	-	-	5	6	6,5	9	30	-
	Enzymatique	16	39	52	68	78	75	74	68	20	-

d'intervalles de temps ne dépassant pas 4 heures, on voit d'après les résultats qui précèdent, qu'il n'y aura pas lieu de soustraire une hydrolyse spontanée pratiquement négligeable.

A l'examen des courbes du schéma VI (page suivante), il apparaît nettement que l'optimum thermique se déplace vers des valeurs plus basses au fur et à mesure qu'on augmente le temps d'hydrolyse : nous constatons en effet pour une hydrolyse d'une demie heure, un optimum en pointe assez net à la température de 55°. Pour des temps d'hydrolyse d'une heure et de deux heures, l'optimum thermique se présente sous la forme d'un plateau étal de 47° à 55°. Enfin pour des temps d'hydrolyse de trois et quatre heures, l'optimum thermique reprend un aspect en pointe mais cette fois-ci, pour une valeur de 47°. Tout se passe donc comme si pour des intervalles d'hydrolyse relativement longs (3 h. et 4 h.) l'action dénaturante dévolue à la chaleur sur la protéine-enzymatique, avait le temps de s'exercer.

De plus, dès que cet optimum thermique, qu'il soit de 47° pour les hydrolyses relativement longues ou de 57° pour les hydrolyses brèves, a été atteint, on constate avec les températures plus élevées une décroissance très rapide de l'activité de telle sorte que quelque soit le temps d'incubation ($\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, et 4 heures), on remarque pour 67°, une hydrolyse



- Influence de la température sur l'activité de la salicylsulfatase -
Ces cinq courbes sont respectivement relatives, de bas en haut, à des temps d'hydrolyse de $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 et 4 heures.

de 15 à 20 p. 100 et enfin, pour 70°, quelque soit le temps d'incubation, l'hydrolyse ne dépasse pas 10 p. 100.

De ces constatations, on peut donc affirmer que la "salicylsulfatase" entre dans le cas des ferments assez thermo-sensibles. En d'autres termes, nous voyons dans le cas particulier de la salicylsulfatase, l'influence caractéristique exercée par le facteur température vis-à-vis de tout phénomène diastasique quel qu'il soit. Les résultats obtenus se présentent comme la résultante de deux composantes agissant en sens opposé.

a) - Suivant la loi de VANT'HOFF, l'élévation de température favorise toutes les réactions enzymatiques dans la mesure où elles ne sont pas elles-mêmes autre chose que la traduction d'une réaction purement chimique et c'est ce que traduit la partie ascendante de notre diagramme

b) - Dans un deuxième temps, l'élévation de température se poursuivant, la protéine est progressivement dénaturée (jusqu'à obtenir pour

une température suffisante une dislocation complète) et c'est alors le deuxième versant de la courbe. Dans cette partie du diagramme, à mesure que la température s'élève, les courbes d'hydrolyse pour $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 et 4 heures se superposent progressivement pour arriver à ne former qu'une seule et même courbe à partir de 72° - 73°.

Dans la suite de nos expériences nous n'avons pas retenu cependant cette température optimum de 47° à 55°. Il nous a paru préférable de nous placer à la température du corps humain 37° C, valeur plus physiologique et qui sert le plus communément de terme de comparaison dans les recherches enzymatiques et aussi parce que, ne nous étant pas placés à priori dans les conditions les meilleures possibles, il nous serait plus aisé ultérieurement d'étudier les effecteurs aussi bien dans le sens d'une activation que d'une inhibition éventuelles.

Une autre manière de dissocier les deux composants du facteur température sur la salicylsulfatase va consister maintenant, comme nous l'avons laissé entendre au début de ce chapitre, à faire subir à la préparation enzymatique une série de préchauffages à différentes températures, la température de l'incubation proprement dite en présence de substrat restant invariable à 37°.

2° - Influence du préchauffage du suc d'*Helix* sur son activité "salicylsulfatasique" -

Dés dilutions au 1/50 de suc digestif d'*Helix pomatia* sont préalablement portées 30 minutes à des températures diverses (de + 47° C à + 72° C). On uniformise ensuite rapidement à 37° C toutes ces différentes dilutions de S.D.H. ainsi traitées grâce à un passage à la glacière, puis on additionne chacune de ces solutions enzymatiques de la solution de substrat en milieu tampon acéto-acétique de pH 5,0 et on laisse s'effectuer l'hydrolyse enzymatique au thermostat à cette température de 37° pendant $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 et 4 heures. Les résultats exprimés en pourcentage de substrat hydrolysé, figurent au tableau 17 et sur le schéma VII .

A l'examen de ce tableau et de cette courbe, nous voyons se manifester, et cette fois-ci à l'état pur, l'action dénaturante exercée par la chaleur sur l'enzyme protéine, expliquant par là même, l'action défavorable exercée sur l'hydrolyse enzymatique dès que cette température devient trop élevée. Nous voyons donc que des préchauffages poursuivis une demie heure à 47°, 53° et même 58° ne modifient pas de façon appréciable l'activité enzymatique secondairement appréciée dans les conditions standard habituelles. Mais à partir de 61° C, l'inactivation se précise pour devenir presque totale pour un préchauffage de 72° C.

TABLEAU n° 17 -

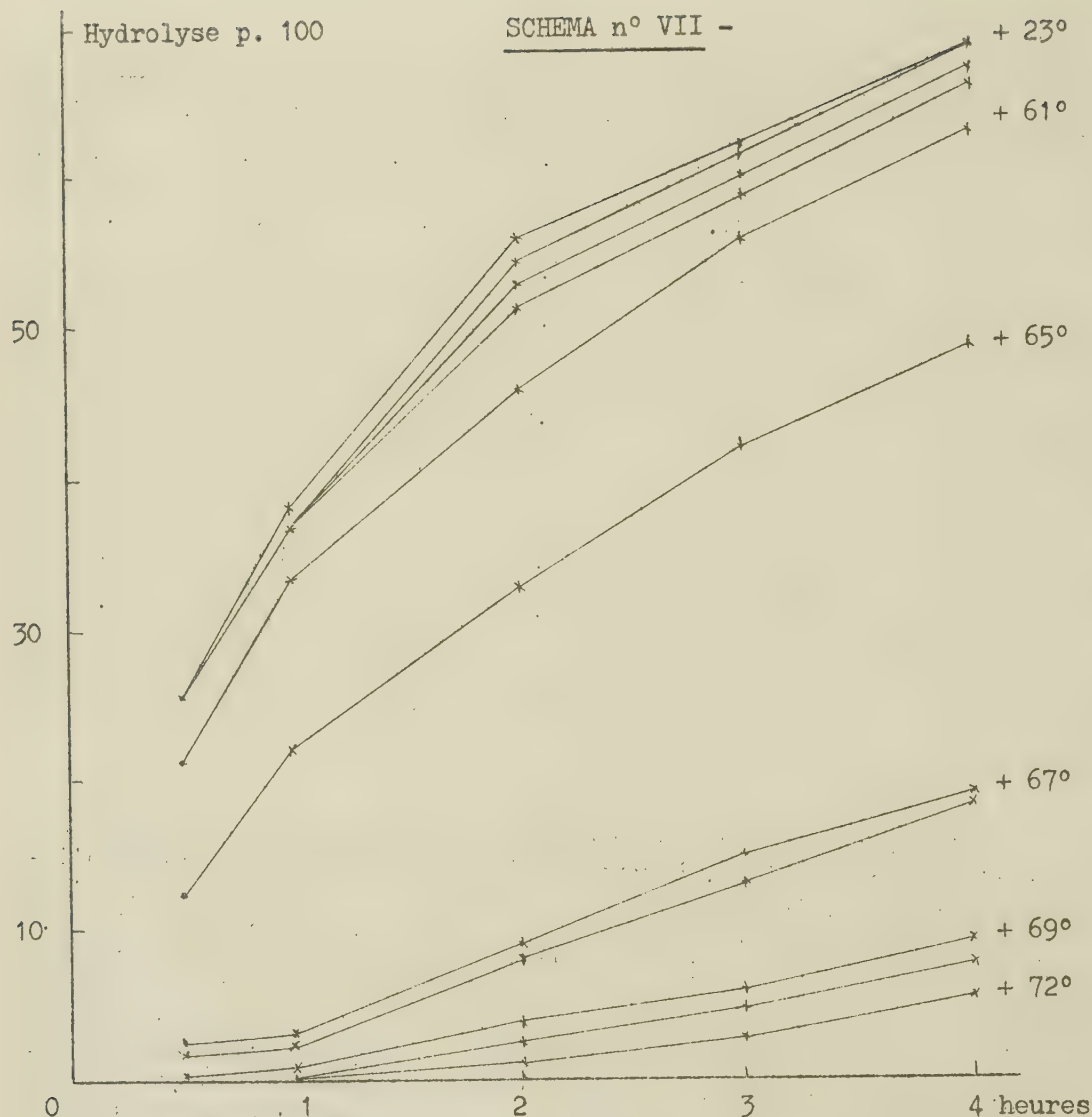
Température du pré- chauffage d' $\frac{1}{2}$ heure	Hydrolyse p. 100 après incubation à 37°,5 pendant				
	$\frac{1}{2}$ h.	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.
+ 23°	24,5	38	55,5	61,5	68,5
+ 47°	24,2	37,5	54	61	68
+ 53°	24,1	37,2	53	60	67
+ 58°	24	37	51,5	59	66
+ 61°	21	33,5	46	56	63
+ 65°	12	22	32,6	42	49
+ 67°	2,5	3	9	15	19
+ 68°	1,5	2,5	8	13	18,5
+ 69°	0,5	0,7	4	6	9,5
+ 70°	0	0	2,5	5	8
+ 72°	0	0	1,5	3	6

Si maintenant nous cherchons à dresser un parallèle entre les deux parties de ce chapitre, à savoir : influence de la température d'incubation d'une part, influence de la température de préchauffage de l'autre (que nous pourrions appeler également température de conservation), nous voyons que dans le premier cas l'influence défavorable de la température se manifeste dès 47° (valeur à laquelle nous avons fixé l'optimum thermique) et que dans le second cas elle ne se manifeste de façon appréciable que pour des températures supérieures à 60°. La raison nous en paraît facilement explicable : au cours d'une incubation poursuivie pendant 4 heures, peuvent s'exercer simultanément, comme nous l'avons souligné précédemment, les deux composantes de la température. Si bien qu'à un moment donné, c'est le facteur dénaturant qui est capable de l'emporter.

Il nous paraît donc extrêmement vraisemblable que si nos températures de préchauffage avaient été maintenues, non pas une demie heure, comme dans nos conditions expérimentales, mais bien pendant 1, 2, 3, et 4 heures, comme il en a été pour nos incubations, nous aurions retrouvé l'influence défavorable de la température pour une valeur sensiblement égale à la première.

Conclusion -

Dans nos conditions expérimentales, l'activité salicylsulfatase présente un maximum pour une température de + 47° C pour des



incubations de 3 et 4 heures et de 55° C pour des incubations de $\frac{1}{2}$, 1 et 2 heures, toutes températures supérieures amenant très rapidement une inhibition à peu près totale de l'enzyme.

Un préchauffage de $\frac{1}{2}$ heure ne modifie pratiquement pas l'activité de la préparation enzymatique quand il a été poursuivi à des températures ne dépassant pas 58° C. Mais à partir de 61° C, une partie du ferment est détruite, de sorte qu'un préchauffage durant une $\frac{1}{2}$ heure à 72° supprime toute hydrolyse pendant des incubations ultérieures à 37° d'une $\frac{1}{2}$, 1, et 2 heures et réduit l'activité au 1/10 de sa valeur quand cette incubation à 37° se prolonge pendant 3 et 4 heures.

CHAPITRE V

INFLUENCE DU TEMPS

Ce chapitre comportera deux paragraphes : dans le premier, nous envisagerons l'influence de la durée de l'incubation à 37° C sur l'activité salicylsulfatasique du S.D.H. et le second sera consacré à l'effet du temps de conservation à la glacière à + 4° C d'une dilution 1/50 de S.D.H. sur cette même activité enzymatique.

1°/- Influence du temps d'incubation -

Nous nous sommes placé dans les conditions habituelles : tampon acéto-acétique 0,05 M, substrat 0,005 M, température d'incubation 37° C, temps d'incubation $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 et 4 heures, S.D.H. dilué au 1/80.

Les résultats sont consignés dans le tableau n° 18 où figurent

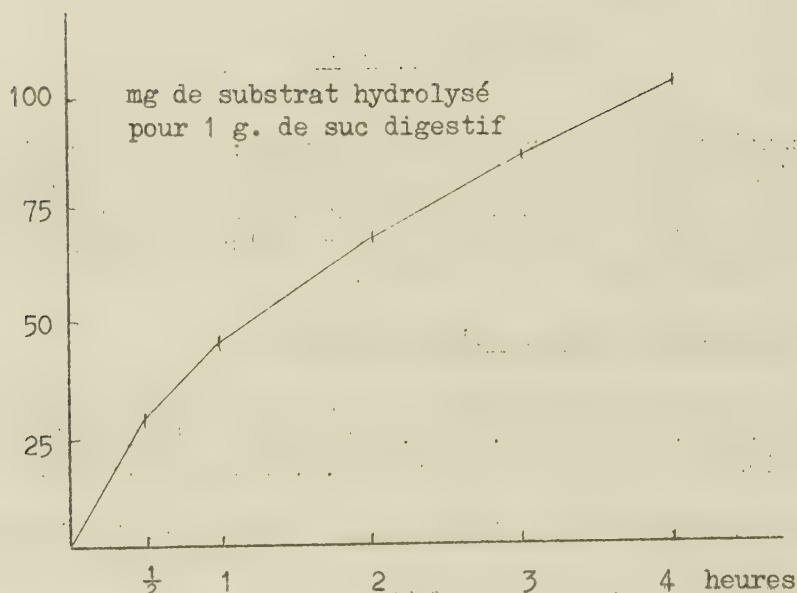
- T : le temps d'incubation en heure
- H : le pourcentage d'hydrolyse du substrat à la dilution utilisée 1/80 -
- Qt : la quantité (exprimée en milligramme) de substrat hydrolysé au temps t de l'incubation et rapportée à 1 ml. de S.D.H. pur.
- $Q_{\infty} - Q_t$: la différence entre les quantités de substrat hydrolysé au temps infini et au temps t.
- $\log (Q_{\infty} - Q_t)$: le logarithme vulgaire de l'expression précédente ($Q_{\infty} - Q_t$).

Nous avons tracé la courbe $Q_t = f(t)$ exprimant les quantités de substrat hydrolysé en fonction du temps.

TABLEAU n° 18 -

Temps d'incubation	Hydrolyse p. 100	Qt en mg	$Q_{\infty} - Q_t$	$\log (Q_{\infty} - Q_t)$
0 h.	0	0	191	2,281
$\frac{1}{2}$ h.	14	29	180	2,255
1 h.	22	46	163	2,212
2 h.	33	69	140	2,146
3 h.	41	87	122	2,086
4 h.	49	103	106	2,025
∞	-	209	-	-

SCHEMA n° VIII -



- Influence du temps d'incubation. S.D.H. utilisé : 1/80, c.à.d. concentration finale du mélange réactionnel en S.D.H. = 1 p. 160.

Cette courbe a l'allure exponentielle ; elle est du type :

$$Q_t = Q_{\infty} (1 - e^{-\lambda t})$$

Comme de plus nous avons vérifié que la représentation graphique de la fonction $\log (Q_{\infty} - Q_t) = f(t)$ était une droite (schéma IX), nous pouvons conclure que la réaction d'hydrolyse est du premier ordre.

La vitesse d'hydrolyse est donnée par l'expression (4) :

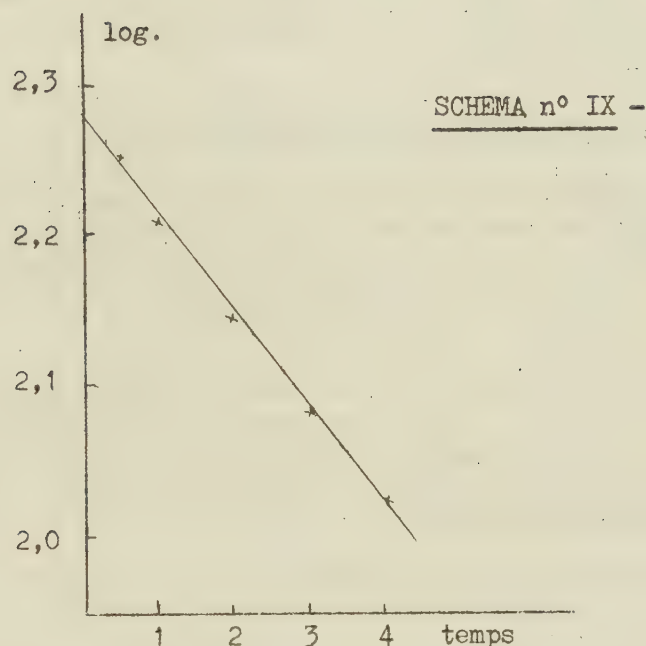
$$V = 2,3 \quad Q_{\infty} \times \lambda$$

Q_{∞} représente la quantité de substrat hydrolysé après un temps d'incubation très long ($t = \infty$) par une dilution de S.D.H. 1/80 et rapportée à 1 ml. de S.D.H. pur. Pour l'obtenir, on multiplie la quantité de substrat mis en jeu au début de l'expérience par l'inverse de la dilution de S.D.H. employée.

$$Q_{\infty} = 2,62 \text{ mg} \times 80 = 209,6$$

λ est la pente de la droite logarithmique $\log (Q_{\infty} - Q_t) = f(t)$ on obtient en faisant le quotient de la différence de deux logarithmes par la différence des temps correspondants (exprimés en heure)

$$\lambda = \frac{2,255 - 2,086}{3 - 0,5} = \frac{0,169}{2,5} = 0,068$$



- Courbe $\log (Q_{\infty} - Q_t) = f(t)$ en ordonnées : $\log (Q_{\infty} - Q_t)$
en abscisses : temps en heure

$$\begin{aligned} 2,255 &= \log (Q_{\infty} - Q_t), \text{ quand } t = \frac{1}{2} \text{ heure} \\ 2,066 &= \log (Q_{\infty} - Q_t), \text{ quand } t = 3 \text{ heures} \end{aligned}$$

D'autre part, l'intersection de la droite logarithmique (schéma IX) avec l'axe des ordonnées nous donne la valeur $\log (Q_{\infty} - Q_t)$ au temps zéro de l'incubation, soit 2,281. Ce log. nous permet de calculer $(Q_{\infty} - Q_t)$ quand $t = 0$, expression que nous appellerons K_0 :

$$K_0 = (Q_{\infty} - Q_t) \text{ quand } t = 0$$

$$\text{or si } \log (Q_{\infty} - Q_t) = 2,281, \quad (Q_{\infty} - Q_t) = 191 = K_0$$

Enfin connaissant toutes les valeurs des termes de l'équation :

$$V = 2,3 \times Q_{\infty} \times \lambda$$

nous pouvons calculer V :

$$V = 2,3 \times 209,6 \times 0,068 \approx 33 \text{ mg/h.}$$

$$V \approx 33 \text{ mg/h.}$$

$$\text{et } Q_t = 191 (1 - a^{-0,068} t) \text{ avec } a = 10$$

Conclusion : Ainsi l'étude de la vitesse d'hydrolyse en fonction du temps nous permet de conclure à des réactions du premier ordre,

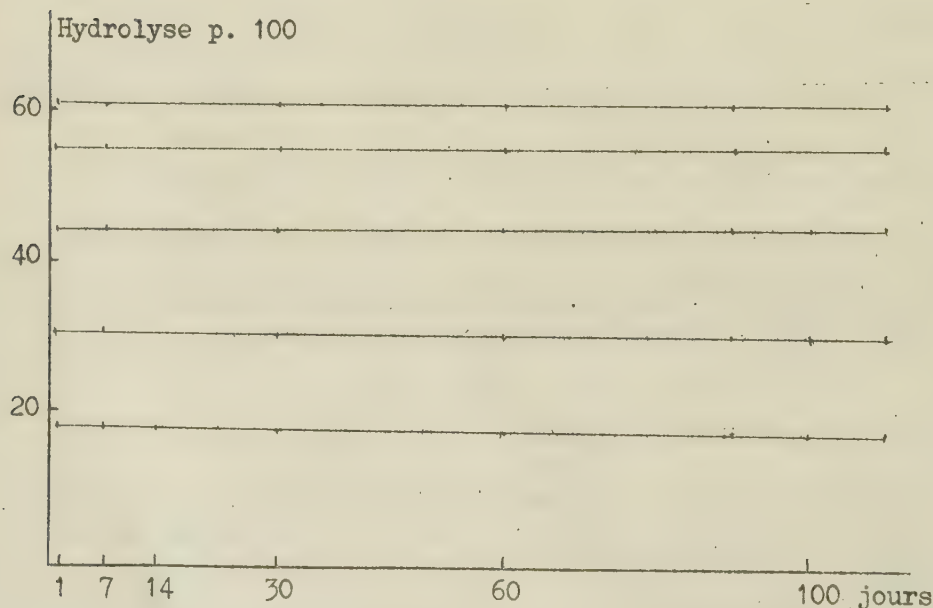
les courbes $\log (Q_{\infty} - Q_t) = f(t)$ étant rectilignes comme nous venons de le voir. L'hydrolyse suit la loi exponentielle : $Q_t = K_0 (1 - a^{-\lambda t})$ avec une vitesse $V = 2,3 \times Q_{\infty} \times \lambda$.

2°/- Influence du temps de conservation -

Nous avons examiné les variations de l'activité sulfatasique en fonction du temps de conservation de la préparation enzymatique. Le suc digestif, aussitôt prélevé et très légèrement centrifugé, est dilué au 1/50 avec de l'eau distillée bouillie et stocké dans un flacon à bouchon émeri que l'on conserve à la chambre froide à + 4° C.

Le pouvoir hydrolytique est mesuré après 1 h., 6 h., 12 h., 24 h., 48 h., 4 jours, 6 jours, une semaine, deux semaines.... un mois... de séjour dans les conditions précédentes ; les hydrolyses sont conduites au thermostat à 37° C, en milieu tampon acéto-acétique de pH 5,0 selon la méthode standard habituelle.

Les résultats sont consignés dans le tableau 19 et le schéma X.



SCHEMA X - Influence du temps de conservation à + 4° sur l'activité enzymatique. En abscisses : le nombre de jours et en ordonnées : l'activité enzymatique.

De bas en haut, les différentes courbes sont relatives à des temps d'incubation à 37° de $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, et 4 heures.

TABLEAU n° 19 -

Temps de conservation	Hydrolyse p. 100 après				
	$\frac{1}{2}$ h.	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.
1 heure	18	31	45	55	61
6 heures	18	31	44	56	61
12 heures	17	30	45	55	60
24 heures	18	31	45	55,5	62
48 heures	17,5	30,5	45	56	61
3ème jour	18	30	45	55	62
4ème "	17	31	44,5	53,5	60
6ème "	18,5	31,5	45	54	61
9ème "	18	32	44	55	61,5
13ème "	17	31	45	54	60,5
18ème "	18	30	44	56	61
24ème "	17,5	30,5	45	53	60
30ème "	18	31	44	54	60,5
40ème "	17	30	44	55	61
50ème "	17	30	45	54	61,5
60ème "	18	32	44	53	61
70ème "	17	30	44	52	60
80ème "	18	30	44	53	61
90ème "	17	29	43	52	60
100ème "	17	31	42	51	60

A l'examen de ces différents résultats, il ressort que l'activité enzymatique n'a pas diminuée, la conservation a été excellente, tout au moins pour cette activité "salicylsulfatasique" ; mais l'activité n'a pas non plus augmentée : or la question se pose, car il est des cas où l'on note :

- soit un regain d'activité constatée au voisinage du 70ème jour, après une perte primitive notable pendant le laps de temps précédent (cas de la procaïnesterase du sérum de cheval d'après DASTUGUE et MATHON (32).

- soit une augmentation progressive se manifestant presque d'emblée, jusqu'à un certain degré (cas de la xanthine-déhydrase du lait), d'après POLONOVSKI (121).

Ces modifications apparaîtraient dans les cas où l'enzyme se trouve présent sous la forme de cénapses lipido-protéidiques qui, on le sait, sont rompues avec le temps et libèrent ainsi une nouvelle fraction de ferment.

En sens inverse, peut-être, pouvons-nous conclure que, lorsque ces modifications ne se produisent pas (cas de la salicylsulfatase), le ferment n'est pas inclu dans un tel complexe.

CHAPITRE VI

INFLUENCE DE LA CONCENTRATION EN ENZYME ET EN SUBSTRAT

1°/- Influence de la concentration en enzyme -

Pour l'étude de cette influence nous nous plaçons dans les conditions opératoires suivantes : tampon acéto-acétique, pH = 5,0 , température d'incubation 37° C, temps d'hydrolyse $\frac{1}{2}$ h., 1 h., 2 h., 3 h. et 4 heures ; la seule variante apportée d'une série d'expériences à l'autre réside dans la valeur de la dilution du suc d'Helix utilisée.

A cet effet, nous préparons les dilutions de suc digestif d'Helix suivantes : 1/20, 1/40, 1/80, et 1/120 . Ainsi après addition du milieu tampon, nous réalisons des concentrations finales en enzyme de 1 p. 40, 1 p. 80, 1 p. 160, et 1 p. 240.

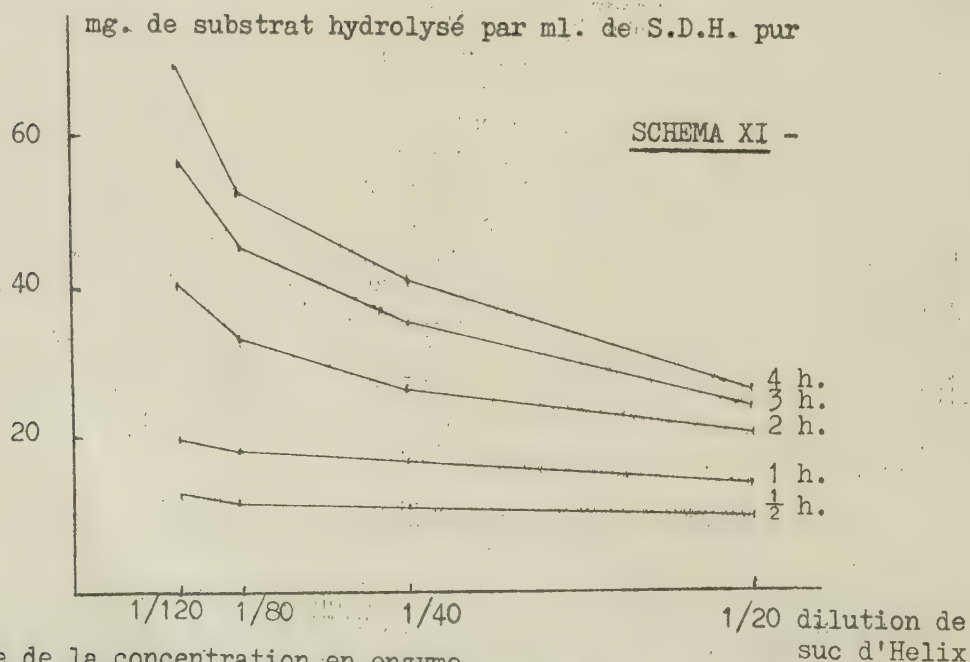
On constate alors une augmentation très nette des pourcentages d'hydrolyse avec la concentration en enzyme, comme on pouvait d'ailleurs s'y attendre a priori. Seulement on remarque d'après les chiffres expérimentalement obtenus que l'accroissement de la vitesse de la réaction, pour si sensible qu'elle soit, n'est pas parallèle à l'augmentation de la concentration en enzyme. Ainsi dans les mêmes conditions où la concentration en enzyme est multipliée par 6 (de 1/120 à 1/20) le pourcentage de substrat hydrolysé n'est multiplié que par 4 (cela pour $\frac{1}{2}$ heure d'incubation) et par 2 seulement quand il s'agit de 4 heures d'incubation. C'est ce phénomène qui est encore plus apparent à la lecture de la deuxième partie du tableau 20 où les résultats sont exprimés, non plus en pourcentage d'hydrolyse, mais en milligrammes de substrat hydrolysé par ml de suc digestif d'Helix. On aperçoit alors que cette quantité, qui est de 12 mg. pour une concentration finale en suc de 1 pour 240, n'est que de 9 mg pour une concentration 1 p. 40 et ceci avec un temps d'incubation d'une demie-heure. A mesure que la durée d'incubation augmente, la différence s'accroît davantage, de telle sorte qu'au bout de 4 heures, nous passons pour les mêmes valeurs, de 69 mg. à 25 mg. seulement.

2°/- Influence de la concentration en substrat -

Nous utilisons pour les expériences relatées dans ce paragraphe une dilution de suc digestif d'Helix au 1/50 avec de l'eau distillée bouillie. On opère comme précédemment en tampon acéto-acétique à la concentration finale 0,05 M, en mettant à incuber pendant $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3 et 4 heures 1 ml de S.D.H. 1/80 en présence de 1 ml de tampon acétique à pH 5,0 contenant le substrat ; la seule variante, cette fois-ci, d'une expérience à l'autre, résidera dans la concentration du salicylsulfate de sodium ajouté au milieu tampon : les taux de substrat allant de 0,00025 M à 0,110 M.

TABLEAU n° 20 -

Dilution de suc digestif d'Helix employée		1/120	1/80	1/40	1/20
Concentration finale en suc digestif d'Helix		1 p.240	1 p.160	1 p. 80	1 p. 40
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	4	5,5	10	18
	1 h.	6,5	9	16	27
	2 h.	13	16	25,5	39
	3 h.	18	22	34	44,5
	4 h.	22	25	39	49
Nombre de mg. de substrat hydrolysé par ml. de suc digestif en	$\frac{1}{2}$ h.	12,576	11,528	10,480	9,432
	1 h.	20,436	18,864	16,768	14,148
	2 h.	40,872	33,536	26,724	20,436
	3 h.	56,592	46,112	35,632	23,318
	4 h.	69,168	52,400	40,872	25,676



Influence de la concentration en enzyme -

En abscisses figurent les valeurs des dilutions de suc d'Helix employées et en ordonnées sont portés les nombres de mg. de substrat hydrolysé par ml. de suc digestif en $\frac{1}{2}$, 1, 2, 3, 4 h. d'incubation et relatifs aux diverses dilutions de suc digestif.

Notons tout de suite que les différences de concentration en substrat n'ont pas apporté de perturbation dans la coloration du Fe Cl^3 tout au moins dans la gamme des concentrations réalisées.

Les résultats obtenus nous ont permis de dresser le tableau 21 et d'établir les différentes courbes des schémas XII et XIII ; les courbes du premier graphique ne représentent que le début de celles du second, mais d'une façon plus détaillée, du fait des échelles différentes pour les valeurs portées en abscisses.

De l'examen de ces différentes courbes et du tableau dont elles sont l'expression, il ressort que la concentration finale optima en substrat, pour que le pourcentage de salicylsulfate hydrolysé soit maximum, se situe aux alentours de 1×10^{-3} M. Pour des concentrations inférieures le pourcentage d'hydrolyse du substrat décroît rapidement. Il est à noter de plus que si l'on ajoute pas de salicylsulfate dans le milieu tampon, aucune hydrolyse ne se produit, d'où on peut inférer que le suc digestif d'Helix ne renferme pas de phénolsulfate ni d'esters salicylés, tout au moins à un taux suffisant pour être perçue par cette méthode.

Par contre, pour les concentrations supérieures, le taux d'hydrolyse décroît mais beaucoup plus lentement.

Il est à noter que les résultats précédents s'entendent comme toujours, déduction faite de toute hydrolyse spontanée.

Dans d'autres séries d'expériences où nous avons employé du S.D.H. dilué 1/50, nous avons fait varier la concentration du mélange réactionnel en substrat (avant toute incubation) de $0,125 \times 10^{-2}$ M à 5×10^{-2} M et au lieu de donner les résultats comme toujours, en pourcentage de substrat hydrolysé, nous les avons exprimés en nombre de milligrammes de salicylsulfate hydrolysé par ml. de S.D.H. 1/50. D'autre part, nous avons tenu compte, comme précédemment, de l'hydrolyse spontanée qui, pratiquement nulle, dans nos conditions expérimentales jusqu'à $0,5 \times 10^{-2}$ M de substrat, peut acquérir quand la concentration en substrat dépasse ce chiffre, une certaine valeur que nous n'étions plus en droit de négliger.

Dans ces conditions, nous constatons (tableau 22 et schéma XIV) que l'augmentation de substrat hydrolysé est parallèle à l'élévation des taux du salicylsulfate mis en jeu pour des concentrations de ce dernier, inférieures à $1,25 \times 10^{-2}$ M. Ensuite l'augmentation de la quantité de substrat hydrolysé s'atténue peu à peu pour des taux de salicylsulfate compris entre $1,25 \times 10^{-2}$ M et 3×10^{-2} M et enfin au-dessus de cette concentration de 3×10^{-2} M, les courbes correspondantes affectent la forme d'un palier : en effet, à partir de ce chiffre, toute augmentation de la concentration en substrat ne se traduit plus par une élévation appréciable de la quantité finalement hydrolysé.

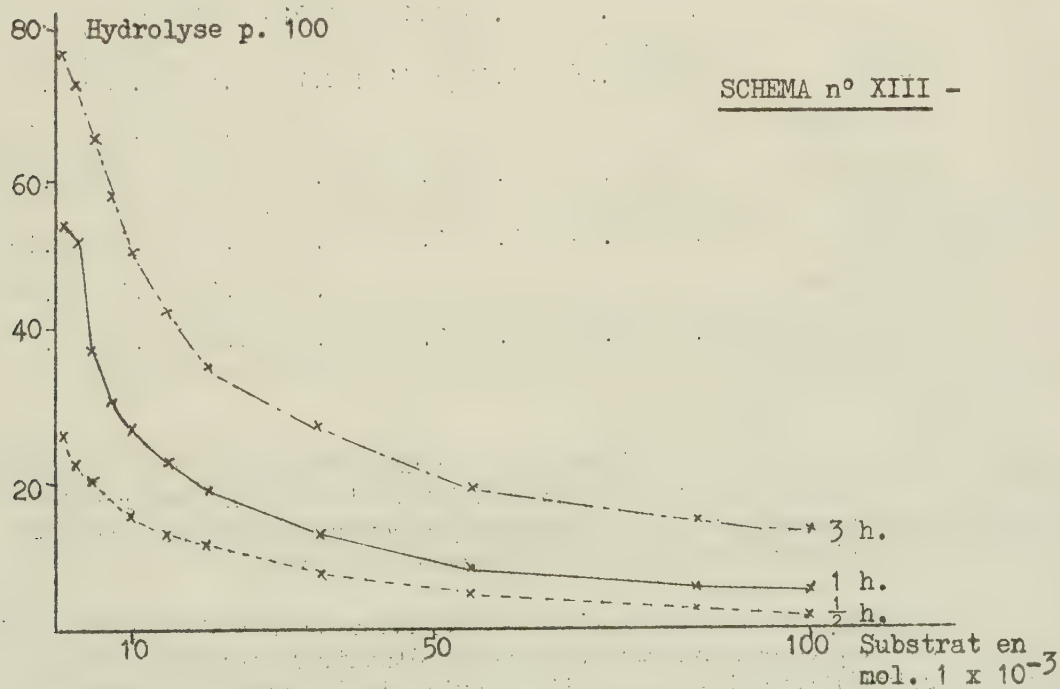
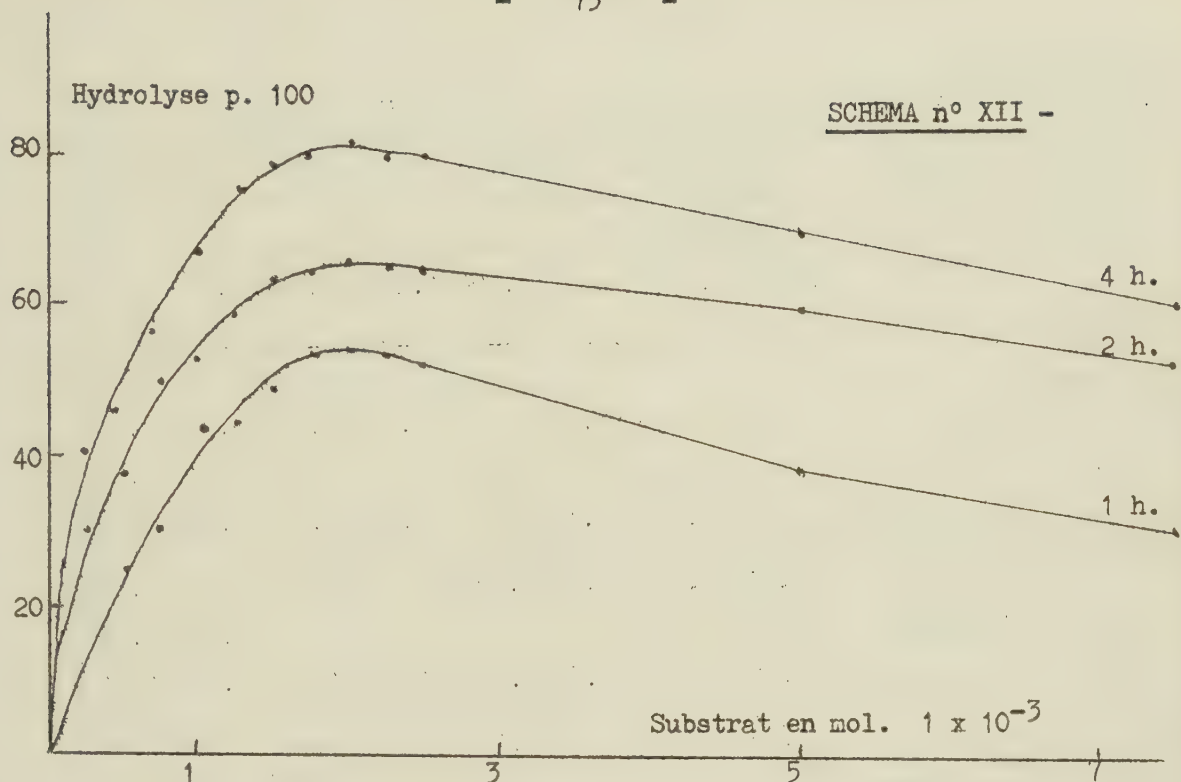
En définitive, nous pouvons dire que les résultats que nous avons

TABLEAU n° 21 -

Teneur en salicylsulfate de sodium dans les tampons employés	Concentration finale en substrat dans le mélange réactionnel	Hydrolyse p. 100 après					
		$\frac{1}{2}$ h.	1 h.	2 h.	3 h.	4 h.	5 h.
nulle	nulle	0	0	0	0	0	0
0,00025 M	0,000125 M	-	-	30	39	41	-
0,00050 M	0,00025 M	-	25	37	45	45	-
0,00075 M	0,000375 M	-	30	50	56	57	-
0,00100 M	0,00050 M	-	44	52	63	67	-
0,00125 M	0,000675 M	-	45	58	74	75	-
0,00150 M	0,00075 M	-	48	63	74	78	-
0,00175 M	0,000875 M	25	54	64	75	78	-
0,00200 M	0,00100 M	25	55	66	76	81	88
0,00225 M	0,001125 M	24	54	64	74,5	80	87
0,00250 M	0,00125 M	22	52	64	72	80	86
0,00500 M	0,00250 M	20	37	60	66	70	77
0,00750 M	0,00375 M	18	31	53	58	61	70
0,01000 M	0,00500 M	16	26	42	50	58	63
0,01500 M	0,00750 M	14	22	34	42	46	-
0,02000 M	0,01000 M	13	19	29	35	39	-
0,03500 M	0,01750 M	7	13	22	27	30	-
0,05500 M	0,02750 M	5	9	16	19	21	-
0,08500 M	0,04250 M	3,5	6	11	15	17	-
0,11000 M	0,05500 M	3	5,5	10	14	16	-

ainsi mis en relief avec la salicylsulfatase, sont parfaitement conformes à ceux que la majorité des auteurs ont obtenu avec un grand nombre de ferments. Ils peuvent aisément s'expliquer en admettant que c'est moins la concentration en enzyme et la concentration en ferment qui influencent la cinétique enzymatique que la teneur du milieu en complexe de Michaelis (enzyme + substrat).

Pour toutes nos expériences, en dehors de celles décrites dans ce paragraphe, nous avons choisi la concentration en substrat de 0,005 M,



En abscisses nous avons porté les valeurs des concentrations en salicylsulfate des milieux tampons acétiques que l'on ajoute au S.D.H. dilué au 1/80 pour réaliser le mélange réactionnel. En ordonnée figurent les pourcentages de substrat hydrolysé.

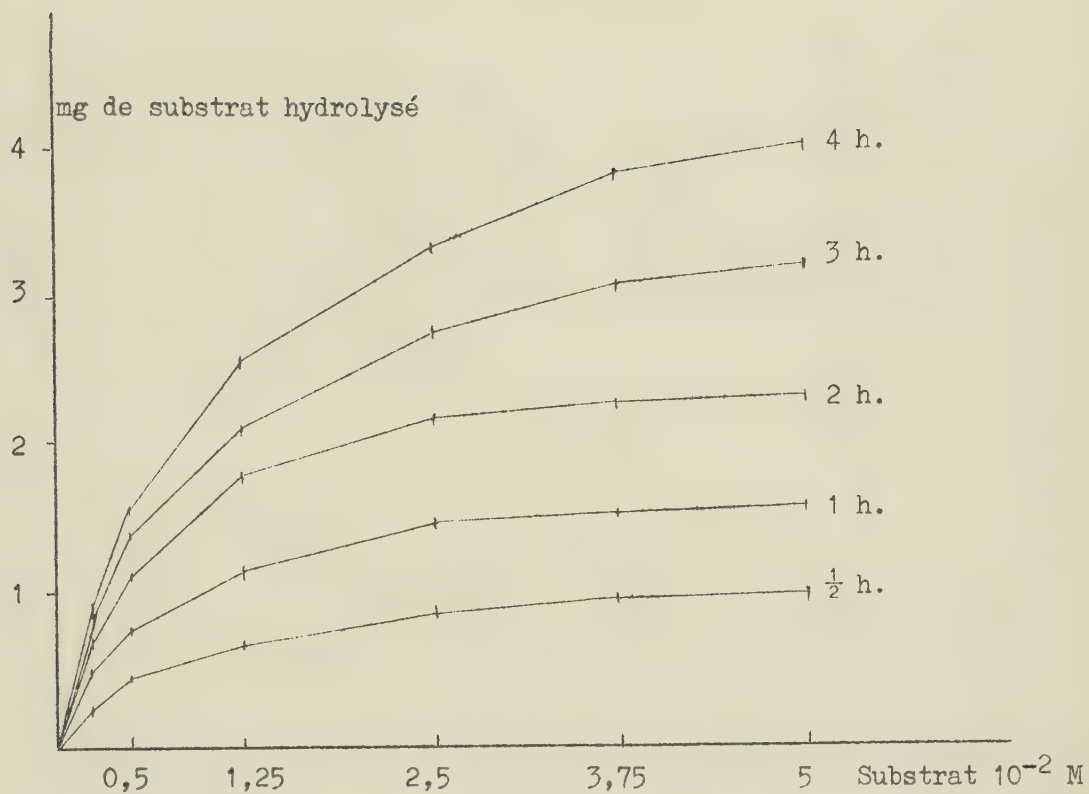
TABLEAU n° 22 -

Temps d'incu- bation	Nature de l'hydrolyse	Nombre de mg de substrat hydrolysé par ml. de suc digestif d'Helix au 1/50 quand la concen- tration du mélange réactionnel en substrat au départ est de :							
		0,125 x 10 ^{-2M}	0,250 x 10 ^{-2M}	0,375 x 10 ^{-2M}	0,500 x 10 ^{-2M}	1,250 x 10 ^{-2M}	2,50 x 10 ^{-2M}	3,75 x 10 ^{-2M}	5 x 10 ^{-2M}
$\frac{1}{2}$ h.	Totale	0,16	0,26	0,37	0,47	0,68	0,89	1,0	1,03
	Spontanée	0	0	0	0	0	0	0,01	0,01
	Enzymatique	0,16	0,26	0,37	0,47	0,68	0,89	0,99	1,02
1 h.	Totale	0,31	0,52	0,68	0,79	1,18	1,47	1,57	1,65
	Spontanée	0	0	0	0	0	0	0,02	0,04
	Enzymatique	0,31	0,52	0,68	0,79	1,18	1,47	1,55	1,61
2 h.	Totale	0,39	0,73	0,97	1,15	1,81	2,23	2,60	2,67
	Spontanée	0	0	0	0	0	0,03	0,05	0,08
	Enzymatique	0,39	0,73	0,97	1,15	1,81	2,20	2,55	2,59
3 h.	Totale	0,50	0,86	1,18	1,41	2,17	2,83	3,22	3,35
	Spontanée	0	0	0	0	0,03	0,08	0,10	0,13
	Enzymatique	0,50	0,86	1,18	1,41	2,14	2,75	3,12	3,22
4 h.	Totale	0,55	0,94	1,26	1,57	2,62	3,40	3,98	4,19
	Spontanée	0	0	0	0	0,05	0,10	0,13	0,20
	Enzymatique	0,55	0,94	1,26	1,57	2,57	3,30	3,83	3,99

Or, nous venons de le voir, ce n'est pas la concentration optima ; si nous nous sommes fixé cette teneur en salicylsulfate, c'est bien pour réaliser une gamme étalon provoquant des déviations qui couvrent toute la graduation du photocolorimètre auquel nous nous sommes adressé.

En effet, si nous nous étions placé aux concentrations 100×10^{-5} les déviations du photocolorimètre (servant à établir le pourcentage de substrat hydrolysé) pour des temps d'incubation de $\frac{1}{2}$ heure à 5 heures, se seraient toutes trouvées entre les graduations 100 et 90, d'où un manque de précision.

SCHEMA n° XIV -



Influence de la concentration en substrat

En abscisses : Concentration du mélange réactionnel en substrat avant toute incubation -

En ordonnées : Nombre de mg de substrat hydrolysé par ml. de S.D.H. au 1/50 .

CHAPITRE VII

" SALICYLSULFATASE " et ELECTROPHORESE DE ZONE

Nous avons voulu, dans ce chapitre, comparer la migration électrophorétique du suc digestif d'Helix avec celle d'un sérum humain normal. A cet effet, nous avons commencé cette étude en nous plaçant dans les conditions habituelles pour la réalisation d'un protéinogramme sérique : les électrophorèses sont effectuées dans une solution tampon de barbital sodique et d'acétate de sodium de pH 8,6 et de concentration ionique 0,1 ; la durée du passage du courant électrique est fixée à 13 heures après dépôt de 0,01 ml. de solution protéique (sérum humain S.H. ou suc digestif d'Helix S.D.H.). Nous avons utilisé l'appareil ELPHOR H selon la technique de GRASSMANN et HANNIG (69).

Dans les trois cuves A, B et C, nous avons fait migrer simultanément :

- | | | | |
|---|---|------------------------------------|---|
| A | (| - suc <u>d'Helix</u> dilué au demi | : bande révélée |
| |) | - sérum humain normal | : bande révélée |
| B | (| - suc d'Helix dilué au demi | : bande destinée à l'activité enzymatique |
| |) | - sérum humain normal | : bande révélée |
| C | (| - suc d'Helix dilué au demi | : bande destinée à l'activité enzymatique |
| |) | - sérum humain normal | : bande révélée |

Les bandes révélées ont été colorées à l'amidoschwartz 10 B selon les indications de GRASSMANN et enregistrées. Les bandes destinées à l'activité enzymatique sont séchées 30 minutes à la température du laboratoire, puis coupées transversalement en petites bandelettes de 1 cm de large à partir du trait de dépôt de la solution protéique. Chaque bandelette, elle-même recoupée en petits fragments, a été déposée dans un tube à essai contenant 1 ml. d'eau distillée et 1 ml. de solution 0,01 M de substrat en tampon acéto-acétique M/5 de pH 5,0.

D'après la bandelette introduite, les tubes sont numérotés de 1 à 15 et portés au thermostat à 37° C, soit 2 heures, soit 4 heures. Après cette incubation, nous complétons à 20 ml. chaque tube avec de l'eau distillée. Deux gouttes de perchlorure de fer sont ajoutées et les différentes solutions sont passées au photocolorimètre.

Comme la quantité totale de S.D.H. soumis à la migration élec-

trophorétique (0,01 ml. de suc au demi repris ensuite par 1 ml. d'eau distillée) représente 1 ml. de suc au 1/200, un essai portant sur 1 ml. de S.D.H. au 1/200, mis en présence de 1 ml. de tampon acétique renfermant le substrat, a été soumis à l'hydrolyse enzymatique dans des conditions identiques.

Les moyennes de 5 séries d'expériences, toutes concordantes, figurent au tableau n° 23.

TABLEAU n° 23 -

N° des bandelettes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	T
Hydrolyse p. 100 après 2 heures d'incubation	0	0	0	0	0	7	15	1	0	0	0	0	0	0	0	20
Hydrolyse p. 100 après 4 heures d'incubation	0	0	0	0	0,5	14	21	2	0	0	0	0	0	0	0	32

L'hydrolyse totale ainsi obtenue :

- en 2 h. : $7 + 15 + 1 = 23$ p. 100
- en 4 h. : $0,5 + 14 + 21 + 2 = 37,5$ p. 100

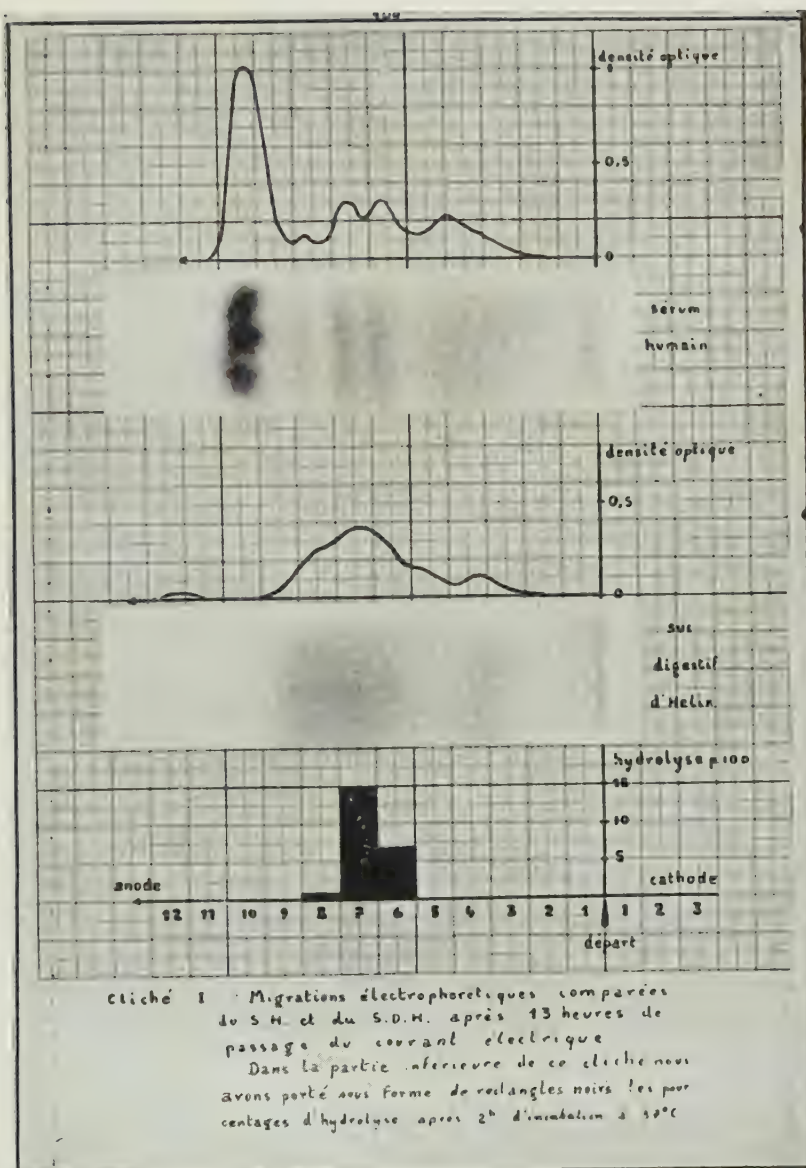
L'essai conduit sur du S.D.H. 1/200 non soumis à une migration électrophorétique, a donné :

- en 2 h. : 20 p. 100
- en 4 h. : 32 p. 100

Ces résultats sont explicités sur le cliché où nous voyons que l'activité enzymatique est située dans la zone de migration des β globulines, entre les α_2 et les γ globulines du sérum humain normal pris comme terme de référence. Elle correspond à une fraction de teneur relativement forte en protéines du S.D.H.

Ces résultats sont à rapprocher de ceux obtenus dans les mêmes conditions par JARRIGE, HENRY et THEVENET (77) qui, vis-à-vis du p. nitro-phénylsulfate de potassium, trouvent que la vitesse de migration de la phénolsulfatase du S.D.H. est comprise entre celles des β et des γ globulines d'un sérum humain normal pris comme témoin.

Nous avons envisagé ensuite l'influence de la durée de l'électrophorèse sur les modalités de la migration du S.H. et du S.D.H. toujours en tampon barbital sodique et acétate de sodium à pH 8,6. Les pourcentages d'hydrolyse après 2 heures d'incubation et relatifs à 0 h., 1 h., 3 h., 4 h., 8 h., 13 h., 19 h. et 24 heures de migration figurent au tableau numéro 24 de la page suivante.



...

• • • • •

[illegible]

TABLEAU n° 24 -

Numéro des bandelettes	Temps de migration							
	0 h. ou témoin	1 h.	3 h.	4 h.	8 $\frac{1}{2}$ h.	13 h.	19 h.	24 h.
- 4	0	0	0	0	0	0	0	0
- 3	0	0	0	0	0	0	0	0
- 2	0	0	0	0	0	0	0	0
- 1	11	0	0	0	0	0	0	0
1	9	1	0	0	0	0	0	0
2	0	9	10	0	0	0	0	0
3	0	12	18	0	0	0	0	0
4	0	0	2	7	0	0	0	0
5	0	0	0	20	6	1	0	0
6	0	0	0	2	15	10	2	0
7	0	0	0	0	5	12	13	2
8	0	0	0	0	0	2	5	13
9	0	0	0	0	0	0	0	3
10	0	0	0	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0	0	0	0

Pour obtenir une plus grande précision dans la comparaison des migrations du S.H. et du S.D.H., nous avons, dans ce cas, découpé une fente de 2 à 3 m/m de large au milieu de chaque bandelette de papier électrophorétique : un côté recevant le S.D.H. et l'autre le S.H.

On constate ainsi une migration très rapide dans les premières minutes, ensuite l'activité enzymatique se déplace de plus en plus lentement à mesure que la durée de l'électrophorèse augmente.

Enfin, en additionnant les pourcentages d'hydrolyse pour chaque bande, on remarque (tableau 25) que l'activité enzymatique totale augmente pour des temps de migrations de 3 et 4 heures et rediminue ensuite à mesure que s'accroît la durée de l'électrophorèse.

Ainsi, après une activation due sans doute à la disparition dans

le mélange réactionnel de substances inhibitrices (contenues dans le S.D. H.), migrant sur la bande de papier, soit plus rapidement, soit plus lentement, on note une baisse d'activité traduisant peut-être une modification de la protéine enzymatique par un passage de plus en plus long du courant électrique.

Temps de	0 h. ou témoin	1 h.	3 h.	4 h.	8 $\frac{1}{2}$ h.	13 h.	19 h.	24 h.
Hydrolyse p. 100 après 2 h. d'incubat.	20	22	30	29	26	26	20	18

Dans une troisième série d'expériences, il nous a paru intéressant d'effectuer les migrations électrophorétiques non plus en tampon véronal-acétate, mais en tampon acéto-acétique à pH 5,0 que nous savons être le milieu le plus favorable à l'activité de la "salicylsulfatase". Là aussi nous avons procédé en deux temps : tout d'abord une série de migrations de 13 heures pour permettre une comparaison plus aisée avec les résultats obtenus sur les protéines plasmatiques du sang humain dans des conditions identiques et ensuite des séries de migrations allant de deux heures à vingt quatre heures.

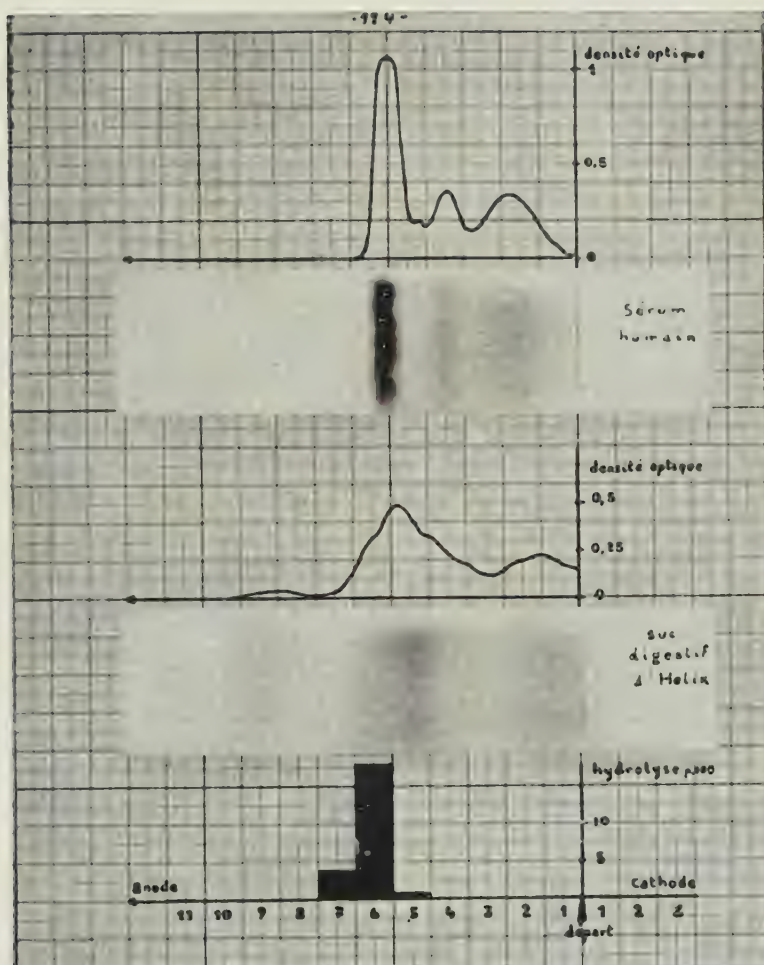
Les expériences sont menées comme précédemment et les moyennes de 5 séries d'électrophorèses sont consignées au tableau 26.

TABLEAU n° 26 -

N° des bandelettes	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	T
Hydrolyse p.100 après 2 heures d'incubation	0	0	0	0	1	18	4	0	0	0	0	0	0	0	0	21
Hydrolyse p. 100 après 4 heures d'incubation	0	0	0	0	3	27	6	0	0	0	0	0	0	0	0	33

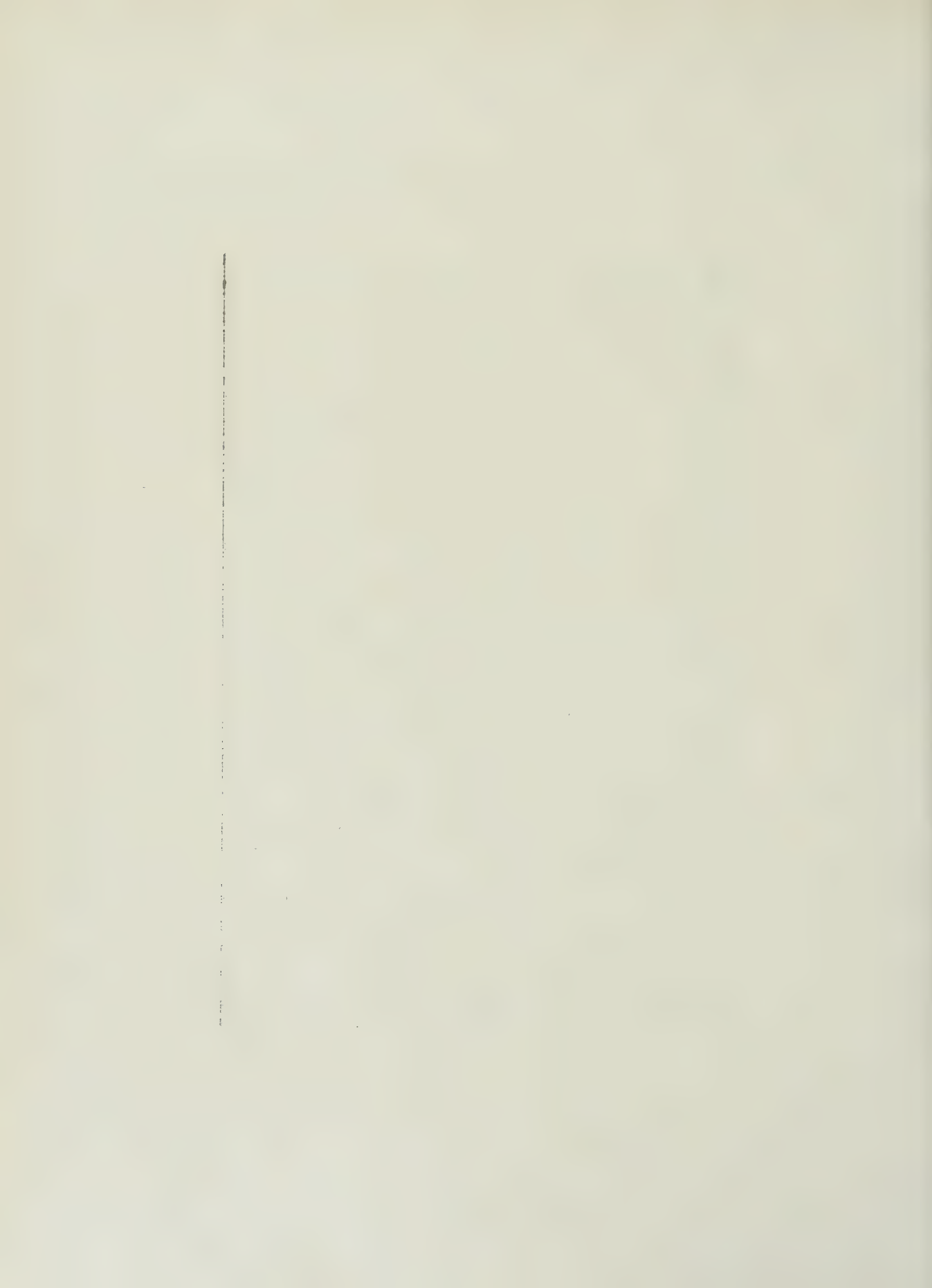
Dans ce tampon acéto-acétique (pH = 5,0) l'activité salicylsulfatasique migre au centimètre 6 de la bande de papier et cela en 13 heures de course, c'est-à-dire presque avec la même vitesse qu'en tampon véronal (pH = 8,6). Par contre, l'étalement du S.H. est beaucoup moins satisfaisant que dans la première série d'expériences relatée dans ce chapitre.

Enfin l'influence du temps de migration (c'est-à-dire du passage du courant) a été testée dans ce tampon acéto-acétique à pH 5,0 tout comme



Cliché II : Migrations électrophorétiques comparées
du S.M. et du S.D.M. en tampon acéto-acétique
pH 8.0 et après 13^h de course.

Dans la partie inférieure de ce cliché, nous
avons schématisé par des rectangles noirs les pour-
centages d'hydrolyse après 2^h d'incubation à 37°C.



nous l'avons fait précédemment en milieu véronal. Les résultats sont contenus dans le tableau n° 27.

TABLEAU n° 27 -

Numéro des bandelettes	Temps de migration				
	0 h. ou témoin	2 h.	9 h.	13 h.	24 h.
- 4	0	0	0	0	0
- 3	0	0	0	0	0
- 2	0	0	0	0	0
- 1	10	0	0	0	0
1	11	0	0	0	0
2	0	0	0	0	0
3	0	0	0	0	0
4	0	0,5	0	0	0
5	0	11	6	1	0
6	0	12	14	17	0
7	0	1	2	5	1
8	0	0	0	0	15
9	0	0	0	0	1
10	0	0	0	0	0
11	0	0	0	0	0
12	0	0	0	0	0
13	0	0	0	0	0
14	0	0	0	0	0

Dans la mesure où il nous est permis d'extrapoler de nos résultats à ceux que nous aurions obtenus dans des conditions comparables sur le plasma humain, nous déduirons que notre enzyme migre entre $\alpha 2$ et γ globulines.

Or, on sait que les globulines $\alpha 2$ sont particulièrement riches en glucoprotéines et c'est entre les $\alpha 2$ et les γ globulines que serait, d'après ENSELME, le groupe de glucoprotéines de l'électrophorégramme.

Faut-il en déduire que notre enzyme appartiendrait au groupe des glucoprotéines ? Il aurait fallu, pour pouvoir l'affirmer, compléter nos protéinogrammes par des glucidogrammes et des lipidogrammes.

Toutefois nous devons ajouter cependant que très vraisemblablement notre enzyme ne se trouve pas sous forme de cénapses, car nous verrons dans un chapitre ultérieur que les agents mouillants qui ont la réputation de libérer les substances liées aux lipides, n'ont produit dans nos conditions expérimentales, tout au moins, aucune modification de l'activité enzymatique du milieu réactionnel.

Il est à noter également, que sur tous les électrophorégrammes de S.D.H. nous n'avons obtenu qu'une seule zone (en cloche) d'activité salicylsulfatasique, contrairement aux résultats communiqués par DOGSON et SPENCER (43), sur l'arylsulfatase des homogénats de Patella et de Littorina d'après lesquels l'électrophorèse de concentrats de protéines urinaires, sur du papier filtre traité préalablement au bromure de cétypyridinium, a montré que deux arylsulfatases (c'est-à-dire deux zones d'activité sur la bande) sont présentes dans l'urine normale exempte de cellules. De plus, les mobilités électrophorétiques de ces deux enzymes étaient identiques à celles des arylsulfatases A et B du foie et d'autres tissus humains.

CHAPITRE VIII

E F F E C T E U R S

1/- Classification des effecteurs étudiés -

Etant donné le nombre des effecteurs étudiés, nous avons dû envisager de les répartir suivant une classification mixte, comme il arrive la plupart du temps en biologie, en considérant tantôt le point de vue physicochimique strict : anions, cations, ... et d'autre part le point de vue pharmacodynamique : anticoagulants, antiseptiques, anesthésiques, antibiotiques

De ce fait, un certain nombre d'éléments pourront se retrouver à deux ou trois chapitres différents de notre exposé, mais leur étude détaillée ne figurera qu'à un seul endroit. Ces redites nous ont paru inévitables, d'autant plus qu'un certain nombre de substances, en particulier les sels, tant de nature minérale qu'organique, peuvent souvent agir aussi bien d'après la nature de la base que de celle de l'acide qui vient la salifier.

Un premier chapitre sera consacré aux anions sous leur forme de sel de sodium en général et un second, aux cations (sous forme de différents sels). Les eaux minérales constitueront un troisième chapitre. Après avoir examiné l'influence de ces quelques substances minérales, nous aborderons l'étude d'un certain nombre de substances organiques (parfois minérales) réparties en sept chapitres : anticoagulants, agents mouillants, alcaloïdes, antibiotiques, acides et sels organiques et quelques substances diverses.

2/- Technique standard employée pour l'étude d'un effecteur -

Dans les chapitres suivants, qui ont trait aux effecteurs, nous avons adopté une technique standard à laquelle cependant, nous avons dû faire subir, dans certains cas particuliers, quelques modifications qui seront indiquées en temps voulu. De façon générale, nous utilisons au départ des dilutions de suc digestif d'escargot au 1/80 ou 1/100 (parfois 1/50), ce qui correspond à une dilution finale de 1/160 ou 1/200 (parfois 1/100). L'effecteur est ajouté à la solution tampon acéto-acétique qui contient également le substrat (salicylsulfate de sodium à la concentration de 0,01 M). Rappelons ici que chaque tube gradué mis au thermostat contient 2 ml. de mélange réactionnel .:

- (1) - soit 1 ml. de tampon acétique (renfermant le substrat et
l'effecteur)
+ 1 ml. d'une dilution de suc digestif d'Helix

(2) - soit 1 ml. de tampon acétique (renfermant le substrat seulement)
+ 1 ml. d'une dilution de suc d'Helix

(3) - soit 1 ml. de tampon acétique (renfermant le substrat et l'effecteur)
+ 1 ml. d'eau distillée bouillie.

Le tube (1) nous donne l'hydrolyse en présence d'effecteur

Le tube (2) c'est le témoin

Le tube (3) donne l'hydrolyse que nous avons qualifiée de "spontanée" et qui doit toujours être retranchée de l'hydrolyse totale, pour obtenir l'hydrolyse enzymatique pure. (en général, cette hydrolyse spontanée est pratiquement nulle, tout au moins pour les temps d'incubation que nous avons adoptés).

Pour chaque effecteur, nous réalisons une gamme de concentrations de 2×10^{-1} à 2×10^{-6} en gramme par ml, c'est-à-dire une concentration finale dans le mélange réactionnel allant de 1×10^{-1} à 1×10^{-6} g/ml.

Nous prenons au papier indicateur "Merck" et à l'électrode de verre le pH de ces solutions tampons ainsi additionnées de l'effecteur à étudier et le pH du mélange réactionnel (tampon + suc d'Helix) avant et après incubation.

Nous vérifions en outre que la concentration en effecteur ne vient interférer en aucune façon avec la coloration violette au perchlorure de fer, déterminée par l'apparition du phénol libéré au cours de l'hydrolyse.

Il est évident que tout précipité ou trouble persistant après l'addition du perchlorure de fer est un obstacle majeur dans la mise en jeu de cette méthode.

CHAPITRE IX

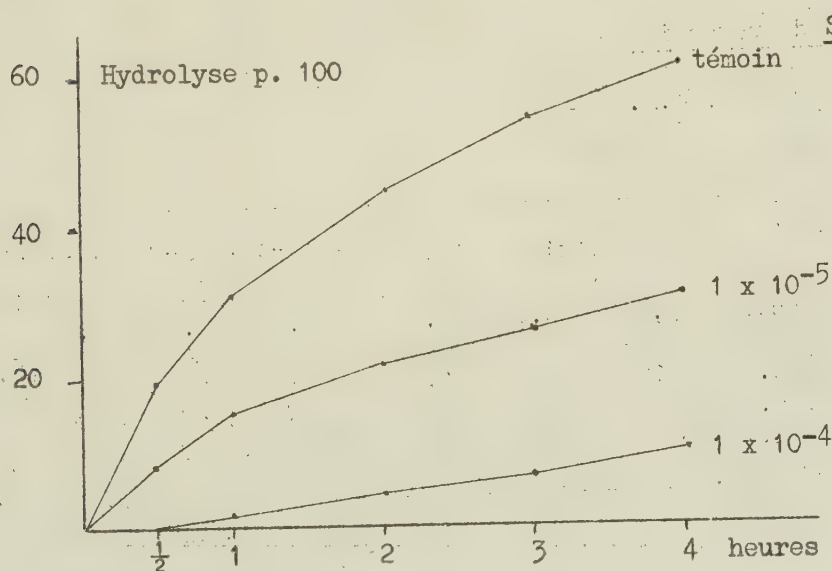
INFLUENCE DE QUELQUES ANIONS

- FLUORURE - Fluorure de sodium : NaF neutre (sans As) purifié.

TABEAU n° 28 -

Concentration finale en fluorure de sodium		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
Ph du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,3
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	16	8	0	0	0
	1 h.	30	28	15	1	0	0
	2 h.	44	43	21	3,5	0	0
	3 h.	54	54	25	6	0	0
	4 h.	61	60	30	9	0,5	0
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	11	55	100	100	100
	1 h.	-	7	50	97	100	100
	2 h.	-	2	52	92	100	100
	3 h.	-	0	54	90	100	100
	4 h.	-	2	52	85	99	100

Une solubilité insuffisante empêche la réalisation de la concentration 1×10^{-1} , mais l'on peut supposer facilement qu'elle serait totalement inhibitrice, indépendamment de la modification du pH qu'elle est susceptible de communiquer au mélange réactionnel.



Influence du fluorure de sodium

- CHLORURE - Chlorure de sodium -

Le produit employé est du NaCl, R.P. cristallisé.

P.M. = 58,45 NaCl % 99 - 100

Les concentrations en NaCl utilisées n'ont pas apporté de coloration autre que celle jaune-claire normale avec les II gouttes de Fe Cl_3 et n'ont pas modifié l'apparition de la coloration violette tant au point de vue qualitatif que quantitatif.

TABLEAU n° 29 -

Concentration finale en Na Cl		témoin	1,25 p.1000	2,5 p.1000	5 p. 1000	10 p. 1000	100 p. 1000
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,8
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	23	21	20,5	19	15	2
	1 h.	35,5	33	31	29	24,5	5,5
	2 h.	53	50	48	45	40	13
	3 h.	65	62	60	58	52	20
	4 h.	72	70	66	64	58	25
	5 h.	76	75,5	70	68,5	63	29
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	8	11	17	35	91
	1 h.	-	7	13	18	31	85
	2 h.	-	6	9	15	25	75
	3 h.	-	5	8	11	20	70
	4 h.	-	3	8	11	20	65
	5 h.	-	0,5	8	10	17	62

- IODURE - Iodure de potassium -

I K , R.P.

TABLEAU n° 30 -

Concentration finale en iodure de potassium		témoin	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p.100 après	$\frac{1}{2}$ h.	15	15	14	15	15	14
	2 h.	37	38	37	38	38	37
	4 h.	55	54	54	55	54	54

- SULFURE - Monosulfure de sodium -

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 31 ; ils sont relatifs à des concentrations finales en monosulfure allant de $0,1 \times 10^{-5}$ à 10×10^{-5} . Nous avons également réalisé pour cet effecteur les concentrations : 1×10^{-1} , $0,5 \times 10^{-1}$, 1×10^{-2} , $0,5 \times 10^{-2}$, et 1×10^{-3} , $0,5 \times 10^{-3}$ et les mélanges obtenus (suc + tampon + effecteur) sont clairs et limpides, sauf pour les concentrations 1×10^{-3} et $0,5 \times 10^{-3}$ qui, deux à trois minutes après leur préparation donnent lieu à un louche blanchâtre gênant pour la lecture colorimétrique.

De plus, les concentrations 1×10^{-1} , $0,5 \times 10^{-1}$, 1×10^{-2} et $0,5 \times 10^{-2}$ communiquent au mélange réactionnel un pH supérieur à 6, valeur du pH qui annule presque toute activité sulfatasique. Enfin, pour toutes ces concentrations, l'empêchement majeur reste l'apparition d'un trouble, voire même d'un précipité après addition du perchlorure de fer avant passage au photocalorimètre.

Pour toutes ces raisons, nous avons été obligés d'abandonner l'appréciation qualitative de l'influence du monosulfure à ces concentrations. Toutefois, nous pouvons émettre l'hypothèse que l'action inhibitrice augmente à mesure que la concentration en monosulfure s'élève, car l'intensité de la coloration violette, si elle n'est pas rigoureusement mesurable, diminue pour disparaître aux fortes concentrations.

TABLEAU n° 31 -

Concentration finale en monosulfure de sodium		témoin	$0,1 \times 10^{-5}$	1×10^{-5}	2×10^{-5}	5×10^{-5}	10×10^{-5}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	11	11	10	9	6	4
	1 h.	20	20	19	18	14	10
	2 h.	33	33	31	30	24	20
	3 h.	41	41	40	38	32	28
	4 h.	49	49	48	46	39	35
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	9	18	45	64
	1 h.	-	0	5	10	30	50
	2 h.	-	0	6	9	27	39
	3 h.	-	0	2	7	22	32
	4 h.	-	0	2	6	20	29

- HYPOSULFITE - Hyposulfite de sodium :

$\text{Na}^2 \text{S}^2 \text{O}_3, 5\text{H}_2\text{O}$ P.M. : 248,21 $\text{Na}^2 \text{S}^2 \text{O}_3, 5\text{H}_2\text{O} \% = 99 - 100$
alcalinité % 2 ml. N/10

Avec les concentrations finales 1×10^{-1} et $0,5 \times 10^{-1}$, il se produit une opalescence à la sortie du thermostat ; de plus, après addition de perchlorure de fer, il se développe une coloration rouge qui s'atténue progressivement : pour ces deux raisons, aucun résultat n'a pu être valablement chiffré, mais il est à noter qu'à ces deux concentrations il n'apparaît pas de coloration violette ou autrement dit, pas de phénol libéré.

Une gamme étalon a dû être faite pour la concentration 1×10^{-3} qui intensifie légèrement la coloration violette. Enfin, trois gouttes de FeCl_3 au lieu de deux, sont nécessaires pour obtenir une coloration violette stable quand la concentration en hyposulfite est de 1×10^{-2} : à cette concentration on doit également refaire une gamme étalon.

Les résultats obtenus sont consignés dans le tableau n° 32.

TABLEAU n° 32 -

Concentration finale en hyposulfite de sodium		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	14	13	12	5	0
	1 h.	24	24	23	20	9	0
	2 h.	38	38	37	35	15	0,5
	3 h.	45	45	44	42	19	1
	4 h.	51	51	51	47	22	2
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	7	14	64	100
	1 h.	-	0	4	16	63	100
	2 h.	-	0	2,5	8	60	99
	3 h.	-	0	2	6	58	98
	4 h.	-	0	0	8	57	96

- SULFATE - Sulfate de sodium - Na_2SO_4 , 10 H_2O

TABLEAU n° 33 -

Concentration finale en sulfate de sodium		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,25 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	18	16,5	15	10	1	0
	1 h.	31	29	26	16	2	0
	2 h.	47	45	40	26	5	0,5
	3 h.	57	54	50	34	7	2
	4 h.	64	61	55	40	11	4
% d'inhibition pour	½ h.	-	8	16	44	94	100
	1 h.	-	6	16	48	93	100
	2 h.	-	4	15	45	89	99
	3 h.	-	5	12	40	88	96
	4 h.	-	5	14	37	83	94

- NITRATE - Nitrate de sodium - Le produit employé est du Na NO_3
R.P. cristallisé -

Na NO_3 : P.M. = 85,01 et Na NO_3 % = 99,8 - 100

TABLEAU n° 34 -

Concentration finale en NO_3 Na		témoin	0,1 p.1000	1 p.1000	5 p.1000	10 p.1000	25 p.1000
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	15	15	14	12	10	5
	1 h.	28	27,5	26	23	19,5	12
	2 h.	42	42	40,5	38	32	20
	3 h.	51	50	48	45	43,5	25
	4 h.	60	60	58	53	51	32
% d'inhibition pour	½ h.	-	0	2	17	30	64
	1 h.	-	2	8	18	31	57
	2 h.	-	0	4	10	24	52
	3 h.	-	2	6	12	15	51
	4 h.	-	0	3	12	15	47

- PHOSPHATE - Phosphate de sodium -

Nous nous sommes adressé au phosphate de sodium R.P. disodique cristallisé, de formule $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ -

P.M. : 358,23 et $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O} \% = 98 - 100$.

Avec une concentration de 1×10^{-1} , on obtient un trouble et un pH par trop différent de 5,0, aussi aucun résultat ne figure dans le tableau 35 pour cette concentration.

TABLEAU n° 35 -

Concentration finale en phosphate disodique		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,4
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	18	17	15	5	0
	1 h.	31	30	30	26	9	0,5
	2 h.	45	45	44	40	13	1
	3 h.	55	55	54	49	18	1
	4 h.	61	61	59	55	21	1,5
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	5	17	72	100
	1 h.	-	3	3	16	71	98
	2 h.	-	0	2	11	71	97
	3 h.	-	0	2	11	67	98
	4 h.	-	0	3	10	65	97

- ARSENATE - Arséniate de sodium - $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ P.M. = 318,08
 $\text{Na}_2\text{HAsO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O} \% = 98 - 100$

Nous n'avons pas pu réaliser la concentration 1×10^{-1} , l'arséniate de sodium étant insoluble à cette dose dans le milieu tampon, d'ailleurs le pH de cette solution aurait été très défavorable.

TABLEAU n° 36 -

Concentration finale en arséniate de sodium		témoin	$0,01 \times 10^{-4}$	$0,1 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	10×10^{-4}	50×10^{-4}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,2	5,35
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	14	13	13	11	5
	1 h.	27	27	25	24	21	12
	2 h.	42	42	40	39	34	19
	3 h.	51	51	49	48	46	26
	4 h.	60	60	58	57	53	30
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	7	7	21	64
	1 h.	-	0	7	11	22	56
	2 h.	-	0	5	7	19	55
	3 h.	-	0	4	6	10	49
	4 h.	-	0	3	5	11	50

- CARBONATE - Carbonate de sodium -

Na_2CO_3 anhydre de P.M. : 106,004 Na_2CO_3 % = 99 - 100

Nous n'avons pas examiné l'influence des concentrations 1×10^{-1} et 1×10^{-2} car ces dernières communiquent au mélange réactionnel un pH supérieur à 6.

TABLeAU n° 37 -

Concentration finale en Na_2CO_3		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,2	5,4	5,7
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	17	18	17	17	14	10
	2 h.	45	45	45	45	40	31
	4 h.	61	61	61	60	64	42

- CARBONATE acide de sodium -

NaHCO_3 R.P. de P.M. : 84,02 NaHCO_3 % = 99,5 minimum

L'influence des concentrations $0,25 \times 10^{-1}$, $0,5 \times 10^{-1}$ et 1×10^{-1} en dehors de la question du pH (très défavorable alors), ne peut être établie car il se produit un louche abondant et une coloration jaunâtre quand on ajoute le perchlorure de fer.

TABLeAU n° 38 -

Concentration finale en NaHCO_3		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,1	5,2	5
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	22	22,	21,5	21	17	1
	1 h.	37	37	36	35	30	1
	2 h.	53	53	53	52	45	1,5
	3 h.	63	63	62	61	57	1
	4 h.	71	71	70	69	64	1,5
	5 h.	77	77	76	75	70	2
% d'inhibition pour	6 h.	82	82	81	80	75	2
	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	2	4	23	95
	1 h.	-	0	3	5	19	97
	2 h.	-	0	2	4	15	97
	3 h.	-	0	1	3	9	98
	4 h.	-	0	1	3	10	98
	5 h.	-	0	1	2	9	97
	6 h.	-	0	1	2	8	97

- BORATE - Borate de sodium -

$\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10 \text{H}_2\text{O}$ de P.M. = 381,43

TABLEAU n° 39 -

Concentration finale en borate de sodium		témoin	0,5x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁶	0,5x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵	0,5x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,2
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	22	22	21	16	15	6	3
	1 h.	35	35	33	26	25	12	6
	2 h.	47	47	46	39	42	22	12
	3 h.	60	60	59	52	52	33	21
	4 h.	66	66	64	59	58	40	26
- % d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	4	27	32	73	86
	1 h.	-	0	6	26	28	66	83
	2 h.	-	0	2	17	11	53	74
	3 h.	-	0	1,5	13	13	45	65
	4 h.	-	0	3	11	12	39	61

Nous avons récapitulé dans le tableau n° 40 (page suivante) les pourcentages d'inhibition relatifs à une heure d'incubation et dus aux différents sels étudiés dans ce chapitre.

Le chlorure de sodium et le nitrate de sodium sont les moins inhibiteurs des sels de sodium étudiés précédemment, mais l'iodure de potassium l'est encore moins, ce qui nous permet de penser à un léger effet inhibiteur dont nous ne pouvons pas dire s'il appartient à l'ion chlore, à l'ion nitrate ou au sodium lui-même. D'autre part, nous n'avons jamais constaté d'effet activateur avec le chlorure de sodium quelque soit sa concentration dans le mélange réactionnel, bien que ROY (124) ait noté une augmentation de 18 p. 100 de l'activité "nitrocatécholsulfatasique" d'extrait de Patella pour une concentration 0,05 M en chlorure de sodium.

Pour le fluorure de sodium, nous retrouvons vis-à-vis de la "salicylsulfatase" le même effet inhibiteur que JARRIGE et HENRY (85) constatèrent vis-à-vis de la "p. nitrophénylsulfatase" du S.D.H. (80 p. 100 quand ces auteurs ajoutaient 20 mg de FNa par 100 ml. de mélange réactionnel, c'est-à-dire 2×10^{-4} g/ml). Nos résultats sont également superposables à ceux de ROY (125) qui note pour la sulfatase de Patella toujours 80 à 90 p. 100 d'inhibition avec des concentrations en fluorure de sodium 0,005 M (soit $2,1 \times 10^{-4}$ g/ml.)

- TABLEAU n° 40 -

Nom de l'effecteur	Concentration finale en effecteur											
	$0,5x$ 10^{-6}	$1x$ 10^{-6}	$0,5x$ 10^{-5}	$1x$ 10^{-5}	$0,5x$ 10^{-4}	$1x$ 10^{-4}	$0,5x$ 10^{-3}	$1x$ 10^{-3}	$0,5x$ 10^{-2}	$1x$ 10^{-2}	$0,5x$ 10^{-1}	$1x$ 10^{-1}
Fluorure de sodium		7		50		97		100		100		
Chlorure de sodium								7	18	31		85
Bromure de potassium												
Iodure de potassium				0		0		0	0	0		
Monosulfure de sodium		0		5	30	50						
Hyposulfite de sodium		0		2,5		8		60		99		
Sulfate de sodium				6		16		48		93		
Nitrate de sodium						2		8	18	31	>57	
Phosphate disodique		3		3		14		71		98		
Arséniate de sodium		0		7		11		22	56			
Carbonate neutre de sod. I		0		0		0	10					
Carbonate acide de sodium		0		3		5		19		97		
Borate de sodium	0	6	26	28	66	83						

Nous retrouvons ici, mais d'une façon plus précise, l'effet inhibiteur du borate déjà constaté dans l'influence du milieu tampon : borate-acide succinique, en dehors de toute variation de l'acidité ionique.

Le fait que le monosulfure, l'hyposulfite et le sulfate de sodium soient en gros de plus en plus inhibiteurs à mesure que le pourcentage de soufre contenu dans la molécule augmente, nous autorise à suggérer un effet défavorable du métalloïde : soufre sur l'activité salicylsulfatasique du S.D.H. Il est à noter que les auteurs précédents (ROY JARRIGE et HENRY) avaient déjà signalé un certain effet inhibiteur des sulfates. De plus, en enzymologie, il est classique d'admettre que les produits d'hydrolyse sont en général freinateurs vis-à-vis de la propre réaction diastasique qui leur a donné naissance.

Comme ROY (125), vis-à-vis de la sulfatase de Patella, nous trouvons un fort pouvoir inhibiteur des phosphates pour l'activité "salicylsulfatasique" du S.D.H., or nous connaissons par ailleurs la présence constante en phosphates de la plupart des liquides biologiques (urine, sérum, etc...) et des extraits tissulaires (foie, rein, cerveau, etc...).

L'arséniate de sodium possède un pouvoir inhibiteur approximativement trois fois supérieur à celui du chlorure ou du nitrate de sodium.

Enfin le carbonate neutre possède à égalité de pH une action inhibitrice moindre que celle développée par le carbonate acide de sodium.

En définitive, sous réserve d'un léger effet inhibiteur propre à l'ion sodium et que nous ne sommes pas en mesure de fixer de façon précise, ni en droit d'écarter totalement, nous présenterons par ordre d'inhibition décroissante la classification suivante des anions expérimentés plus haut :

Fluorure, borate, monosulfure, phosphate, hyposulfite, arséniate, carbonate acide, sulfate, carbonate neutre, nitrate, chlorure et iodure.

CHAPITRE X

INFLUENCE DE QUELQUES SELS

Nous avons réparti les quelques sels étudiés dans ce chapitre d'après la nature du métal que contient chacun d'eux et la classification adoptée est celle de Mendeleeff.

- CITRATE de LITHIUM -

Les concentrations 1×10^{-1} et 1×10^{-2} ne figurent pas dans le tableau pour une triple raison : pH très différent de 5,0 inhibition de la coloration violette et apparition d'une coloration jaune très gênante pour la lecture colorimétrique.

TABLEAU n° 41 -

Concentration finale en citrate de lithium		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse	$\frac{1}{2}$ h.	18	18	17	18	18	16
p. 100	2 h.	44	44	45	44	44	41
après	4 h.	60	61	60	60	60	57

- ACETATE de POTASSIUM -

Nous n'avons pas pu examiner l'influence des concentrations 1×10^{-1} et 1×10^{-2} pour lesquelles, en dehors de la question du pH, différent de 5,0, une coloration jaune sale se produit par addition du perchlorure de fer.

TABLEAU n° 42 -

Concentration finale en acétate de potassium		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	$0,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	1×10^{-3}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse	$\frac{1}{2}$ h.	18	17	18	17	17	18
p. 100	2 h.	45	45	45	44	44	45
après	4 h.	61	60	61	61	61	60

- SULFATE DE CUIVRE - $\text{SO}_4 \text{ Cu} \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$

Les concentrations 1×10^{-1} , $0,5 \times 10^{-1}$ et 1×10^{-2} communiquent une coloration bleue et un pH défavorable au mélange réactionnel : pour ces deux raisons, aucun résultat relatif à ces teneurs en sulfate de cuivre ne figure dans le tableau n° 43.

TABLEAU n° 43 -

Concentration finale en sulfate de cuivre		témoin	1×10^{-5}	$2,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-3}$	$0,5 \times 10^{-2}$
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	19	19	14	7	5	1
	1 h.	30	30	24	13	9	3
	2 h.	46	46	38	22	15	7
	3 h.	56	56	47	29	20	9
	4 h.	62	62	53	34	24	12
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	26	60	74	94
	1 h.	-	0	20	57	70	90
	2 h.	-	0	17	52	67	85
	3 h.	-	0	16	48	62	84
	4 h.	-	0	14	45	61	81

- NITRATE d'ARGENT - Ag NO_3 R.P. de P.M. = 169,89

Pour cet effecteur, nous avons été obligé d'utiliser de l'eau bi-distillée tant pour la préparation du tampon que pour celle de la dilution de S.D.H. de façon à ne pas introduire de chlorures qui pourraient précipiter par l'addition du AgNO_3 . Nous ne pouvons pas non plus introduire directement le AgNO_3 dans le tampon acéto-acétique, car nous obtenons alors un précipité, mais nous pouvons obvier à cet inconvénient en ajoutant au milieu tampon une solution de nitrate d'argent dans de l'eau bi-distillée. Enfin, pour les concentrations en effecteur supérieures à $1,25 \times 10^{-3}$ un trouble après addition du perchlorure de fer empêche toute lecture au photocolorimètre.

(voir tableau n° 44, page suivante)

TABLEAU n° 44 -

Concentration finale en nitrate d'argent		témoin	0,01 x 10 ⁻³	0,15 x 10 ⁻³	0,3 x 10 ⁻³	0,6 x 10 ⁻³	1,25 x 10 ⁻³
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,1	5,3	5,5	5,7
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	17	17	14	12	7	5
	1 h.	18	28	24	18	12	8
	2 h.	32	32	28	22	17	10
	3 h.	50	50	45	42	19	16
	4 h.	55	55	50	46	24	20
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	12	30	59	70
	1 h.	-	0	14	36	57	71
	2 h.	-	0	12	31	47	68
	3 h.	-	0	10	16	62	68
	4 h.	-	0	9	16	56	63

- NITRATE DE MAGNESIUM -

TABLEAU n° 45 -

Concentration finale en (NO ₃) ₂ Mg		témoin	0,1 p. 1.000	1 p. 1.000	5 p. 1.000	10 p. 1.000	50 p. 1.000
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	# 5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18,6	18,6	18,4	17	14	4
	1 h.	27	27	26,3	24	21	5
	2 h.	40	40	40	37	33	11
	3 h.	50	50	50	47	42	15
	4 h.	55	55	55	54	48	17
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	1	9	25	78
	1 h.	-	0	3	11	29	81
	2 h.	-	0	0	7,5	21	73
	3 h.	-	0	0	6	16	70
	4 h.	-	0	0	2	13	69

- CHLORURE DE STRONTIUM -

Sr Cl² R.P.

(voir tableau n° 46 page suivante)

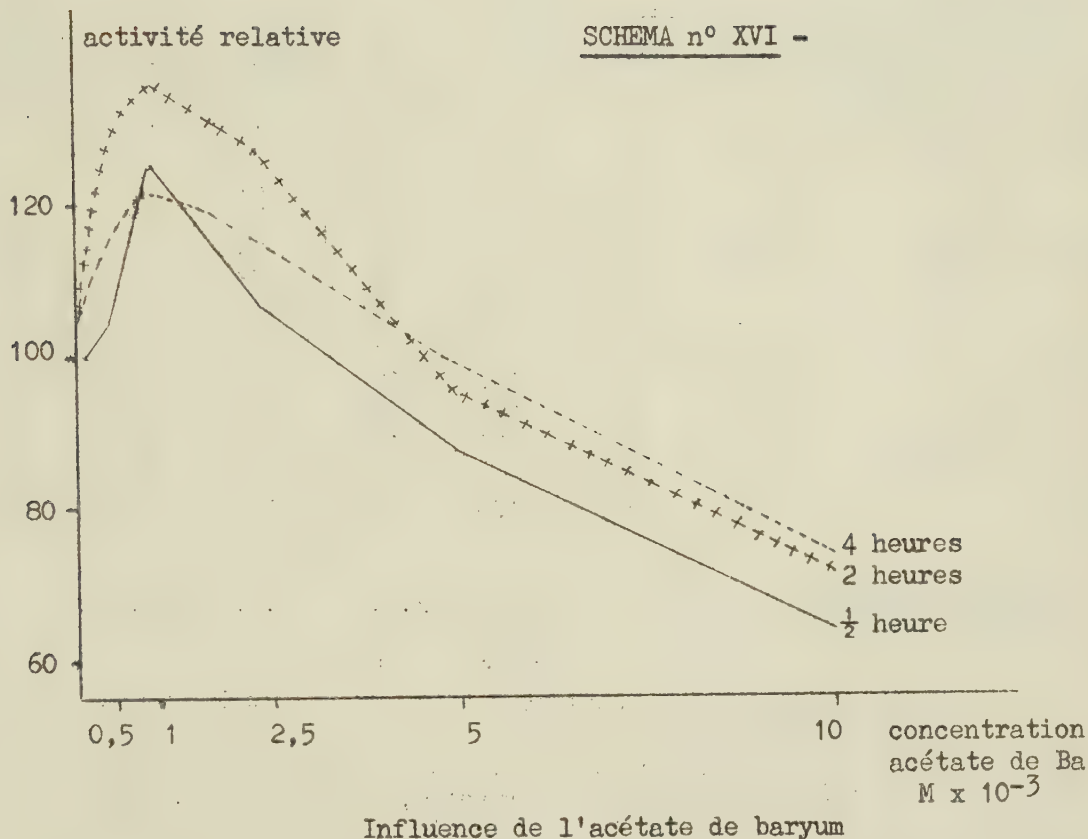
TABLEAU n° 46 -

Concentration finale en chlorure de strontium		témoin	0,001 p.100	0,01 p.100	0,1 p.100	1 p.100	5 p.100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,9
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	12	12	12	12	11	6
	1 h.	23	23	23	23	21	13
	2 h.	37	37	37	36	33	21
	3 h.	46	46	46	46	43	28
	4 h.	52	52	52	51	49	31
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	0	0	7	50
	1 h.	-	0	0	0	8	43
	2 h.	-	0	0	2	10	43
	3 h.	-	0	0	0	6	39
	4 h.	-	0	0	2	6	40

- ACETATE DE BARYUM - Une question de pH empêche d'étudier l'influence d'une concentration en acétate de baryum égale ou supérieure à $0,5 \times 10^{-1}$. A la sortie du thermostat, après les différents temps d'incubation, les tubes contenant le mélange réactionnel présentent un précipité très fin, littéralement collé au fond du tube et ne communiquant absolument aucun trouble après agitation, une fois les II gouttes de perchlorure de fer ajoutées. Une filtration d'ailleurs a été effectuée sur les solutions avant toute lecture au photolorimètre.

TABLEAU n° 47

Concentration finale en acétate de baryum		tém.	1 x 10^{-5}	0,25 x 10^{-4}	0,5 x 10^{-4}	1 x 10^{-4}	0,5 x 10^{-3}	1 x 10^{-3}	2,5 x 10^{-3}	5 x 10^{-3}	10 x 10^{-3}
pH du mél. réaction.		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,2
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	16	16	16	16	16	17	20	17	14	10
	1 h.	26	26	26	26	28	32	35	30	24	17
	2 h.	41	42	42	43	44	53	56	52	39	29
	3 h.	53	54	55	54	55	64	67	63	52	38
	4 h.	60	61,5	62	62,5	64	69	73	69	60	44
Activité RELATIVE pour	$\frac{1}{2}$ h.	100	100	100	100	100	106	125	106	88	63
	1 h.	100	100	100	100	108	123	135	115	92	65
	2 h.	100	102	102	105	107	129	136	127	95	71
	3 h.	100	102	104	102	104	121	126	119	98	72
	4 h.	100	102	103	104	107	115	122	115	100	73



- NITRATE de BARYUM -

(NO³)₂ Ba R.P. P.M. = 261,39

Il est à noter qu'aucune hydrolyse spontanée ne se produit pour les concentrations 1×10^{-4} , 1×10^{-3} et 1×10^{-2} où l'on constate une activation.

Signalons que dans ce cas nous n'obtenons aucun précipité pendant l'incubation, contrairement aux expériences précédentes.

(voir tableau n° 48 page suivante)

TABLEAU n° 48 -

Concentration finale en nitrate de baryum		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,25 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	15	15	16	21	17	11
	1 h.	27	27	29	36	29	20
	2 h.	43	43	44	54	45	32
	3 h.	52	52	54	63	55	39
	4 h.	58	58	60	70	61	45
Activité relative pour	$\frac{1}{2}$ h.	100	100	107	140	113	73
	1 h.	100	100	107	133	107	74
	2 h.	100	100	102	126	105	74
	3 h.	100	100	104	121	106	75
	4 h.	100	100	104	121	105	78

- NITRATE D'URANIUM - $(\text{NO}_3)_2 \text{UO}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ R.P. P.M. : 502,28

U^{308} % 56

(notre échantillon ne contenant aucun autre métal lourd).

La solution tampon contenant 1 g de nitrate d'uranium pour 10 ml. est colorée en jaune-vert, celle renfermant 0,1 g pour 10 ml. est vert-jaune, les concentrations inférieures en nitrate d'urane ne communiquent aucune coloration au milieu tampon. Malgré cette coloration des milieux tampons renfermant de fortes concentrations en nitrate d'urane, aucune modification n'est apportée dans la coloration, tant des témoins que des différents essais.

Les résultats obtenus figurent dans le tableau n° 49 : pour chaque temps d'incubation et pour chaque concentration en nitrate d'urane, nous avons noté l'hydrolyse totale (tampon + effecteur + S.D.H.), l'hydrolyse "enzymatique" (c'est-à-dire la différence entre les deux premières).

Ainsi, à partir de la concentration 10×10^{-3} , nous constatons une hydrolyse spontanée (c'est-à-dire provoquée par le nitrate d'urane) qui s'accroît à mesure que la quantité de nitrate d'urane ajoutée dans le tampon acétate augmente : cette augmentation de l'hydrolyse spontanée est d'ailleurs approximativement linéaire. C'est cette hydrolyse non enzymatique qui, dans nos premières expériences, nous avait fait croire à un regain d'activité pour ces fortes concentrations en nitrate d'urane, alors qu'en réalité, le pourcentage d'hydrolyse enzymatique ne cesse de décroître au fur et à mesure qu'augmente la teneur en effecteur. Signalons que tous nos essais d'hydrolyse spontanée ont été nuls pour la concentration

1×10^{-3} en nitrate d'urane, de même que cette concentration 1×10^{-3} n'intensifie, ni ne diminue la coloration du perchlorure de fer, nous autorisant ainsi à conclure à une activation de la "salicylsulfatase" par cette concentration en nitrate d'urane.

SCHEMA n° XVII -

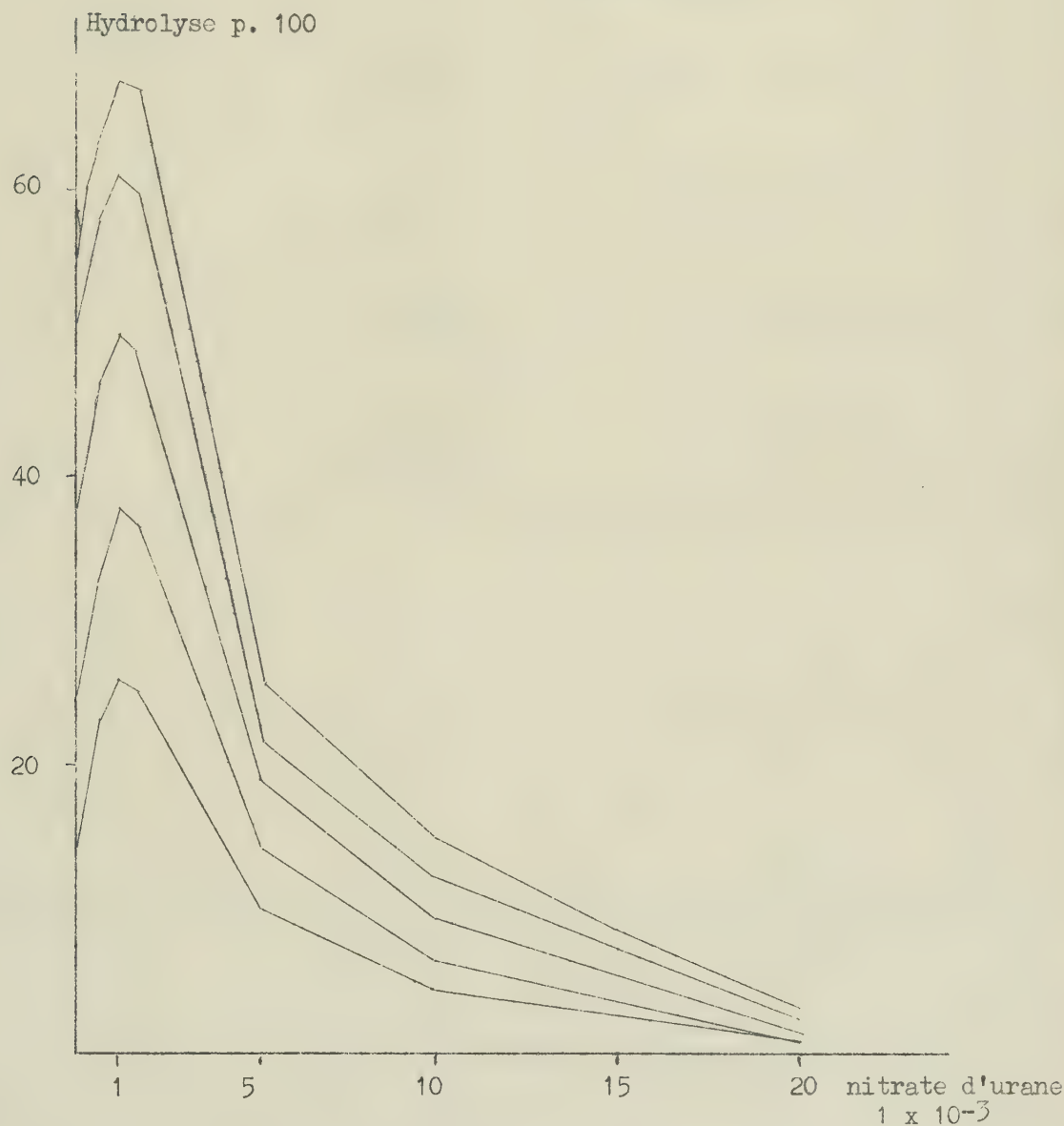


TABLEAU n° 49 -

TABLEAU n° 49

Temps d'incuba- tion	Concentration finale en nitrate d'uranium		Témoin	0,1 p. 1000	0,25 p. 1000
	pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0
$\frac{1}{2}$ h.	Hydrolyse p. 100	Totale	17	19,5	20
		Spontanée	0	0	0
		Enzymatique	17	19,5	20
1 h.	Hydrolyse p. 100	Totale	26	29	30,5
		Spontanée	0	0	0
		Enzymatique	26	29	30,5
2 h.	Hydrolyse p. 100	Totale	39	41	43,5
		Spontanée	0	0	0
		Enzymatique	39	41	43,5
3 h.	Hydrolyse p. 100	Totale	51	52,5	54
		Spontanée	0	0	0
		Enzymatique	51	52,5	54
4 h.	Hydrolyse p. 100	Totale	57	61	62
		Spontanée	0	0	0
		Enzymatique	57	61	62
Activité relative pour		$\frac{1}{2}$ heure	100	115	118
		1 heure	100	112	116
		2 heures	100	105	112
		3 heures	100	103	106
		4 heures	100	107	109

0,5 p. 1000	1 p. 1000	1,5 p. 1000	5 p. 1000	10 p. 1000	20 p. 1000	30 p. 1000	40 p. 1000	60 p. 1000	80 p. 1000	100 p. 1000
5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
24 0 24	26 0 26	25 0 25	9,5 0 9,5	5,5 1 4,5	1,5 1 0,5	6 6 0	7 7 0	7 7 0	8 8 0	9 9 0
54 0 54	38 0 38	36,5 0 36,5	14 0 14	7,25 1,25 6	4 3 1	8 8,15 0	11 11 0	12 12 0	13 13 0	14 14 0
47 0 47	50 0 50	48,5 0 48,5	18 0 18	10 1 9	8 6,5 1,5	13 12,5 0,5	15 14,5 0,5	20 20 0	20 21 0	23 23 0
59 0 59	61 0 61	60 0 60	20,5 0 20,5	13 1,5 11,5	12 9,5 2,5	17 16 1	19 18,5 0,5	26 25,5 0,5	27 27 0	29 29 0
54 0 54	68 0 68	67 0 67	25,5 0 25,5	13,75 1,75 12	15,5 12,5 3	21 20 1	26 25 1	32 31,3 0,7	32 31,5 0,5	35 35 0
141	153	147	56	27	3	0	0	0	0	0
131	132	141	54	23	4	0	0	0	0	0
117	128	124	47	23	4	1,3	1,3	0	0	0
116	120	118	40	23	5	2	1	1	0	0
112	119	118	45	21	5	2	2	1,3	1	0

- ACETATE d'URANIUM - $(\text{CH}_3 - \text{CO}^2)^2 \text{UO}^2$, $2\text{H}_2\text{O}$ R.P. P.M. : 424,26

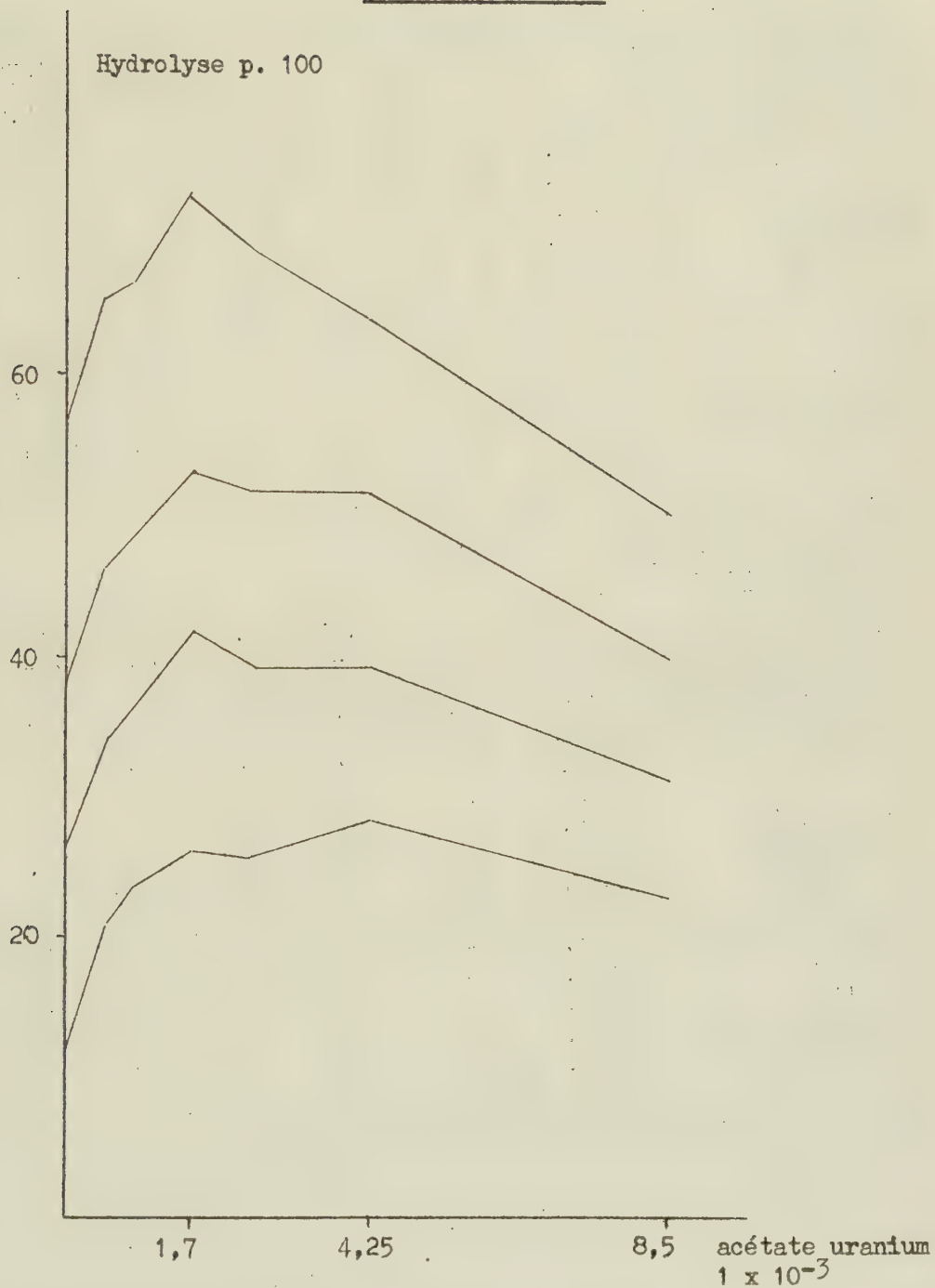
U^{308} % : 66 environ

Cette série d'expériences faisant suite à celle du nitrate d'uranium, nous avons préparé des solutions renfermant le même pourcentage en U^{308} pour essayer de déterminer à quelle partie de la molécule revient l'effet activateur constaté précédemment. A cet effet, on pèse 16,96 g. d'acétate d'uranium que l'on dissout dans 2.000 ml. de tampon acétate, nous obtenons ainsi une solution à 8,48 p. 1000 correspondant à celle renfermant 10 p. 1.000 de nitrate d'urane. Par dilution, nous confectionnons aisément les autres concentrations.

TABLEAU n° 50 -

Concentration finale en acétate d'urane		tém.	0,0212 p. 1.000	0,212 p. 1.000	0,424 p. 1.000	0,848 p. 1.000	1,272 p. 1.000	2,12 p. 1.000	4,24 p. 1.000
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	17	17	21	23	26	25	28	22,5
	1 h.	27	27	34	36,5	41,5	39	39	31
	2 h.	38	41,5	46	48,5	53	52	52	39,5
	3 h.	48	48	56	57,5	63	61	60	46
	4 h.	57	57	65	66,5	73	69	64	49
Activité relative pour	$\frac{1}{2}$ h.	100	100	123	135	153	147	165	132
	1 h.	100	100	126	135	154	144	144	113
	2 h.	100	109	122	128	140	137	137	104
	3 h.	100	100	117	119	131	127	125	96
	4 h.	100	100	114	117	128	121	112	86

SCHEMA n° XVIII -



- Influence de l'acétate d'uranium -

- SULFATE DE ZINC - $\text{SO}_4 \text{Zn}$, 7 H_2O R.P. P.M. : 287,56 et $\text{SO}_4 \text{Zn} \%$ = 56

TABLEAU n° 51 -

Concentration finale en sulfate de zinc		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,5 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	18	17	11	0	0
	1 h.	30	30	29	18	1	0
	2 h.	46	46	45	28	1	0,5
	3 h.	55	55	53	37	2	1
	4 h.	62	62	60	43	3	2
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	5	39	100	100
	1 h.	-	0	3	40	97	100
	2 h.	-	0	2	39	98	99
	3 h.	-	0	4	33	96	98
	4 h.	-	0	3	31	95	97

- ACETATE MERCURIQUE - $(\text{CH}_3 \text{CO}_2)_2 \text{Hg}$

TABLEAU n° 52 -

Concentration finale en acétate mercurique		témoin	0,01x 10 ⁻⁴	0,1x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴	10 x 10 ⁻⁴	50 x 10 ⁻⁴
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	14	13	10	0	0
	1 h.	24	24	24	18	0	0
	2 h.	38	38	38	31	0	0
	3 h.	48	48	47	40	0,5	0
	4 h.	54	54	53	45	1	0
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	7	28	100	100
	1 h.	-	0	0	26	100	100
	2 h.	-	0	0	18	100	100
	3 h.	-	0	2	16	99	100
	4 h.	-	0	2	17	98	100

- CHLORURE MERCURIQUE - "Sublimé" - HG Cl^2

TABLEAU n° 53 -

Concentration finale en chlorure mercurique		témoin	0,1 x 10^{-4}	0,5 x 10^{-4}	1 x 10^{-4}	2,5 x 10^{-4}	5 x 10^{-4}	50 x 10^{-4}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	14	13	11	6,5	3	0
	1 h.	24	24	22	19	12	7	0
	2 h.	38	38	36	32	21	9	0
	3 h.	48	48	45	41	28	11	0
	4 h.	53	53	50	47	34	12	0
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	7	21	53	79	100
	1 h.	-	0	8	20	50	71	100
	2 h.	-	0	5	16	45	60	100
	3 h.	-	0	6	14	41	77	100
	4 h.	-	0	6	11	36	77	100

- ACETATE DE PLOMB -

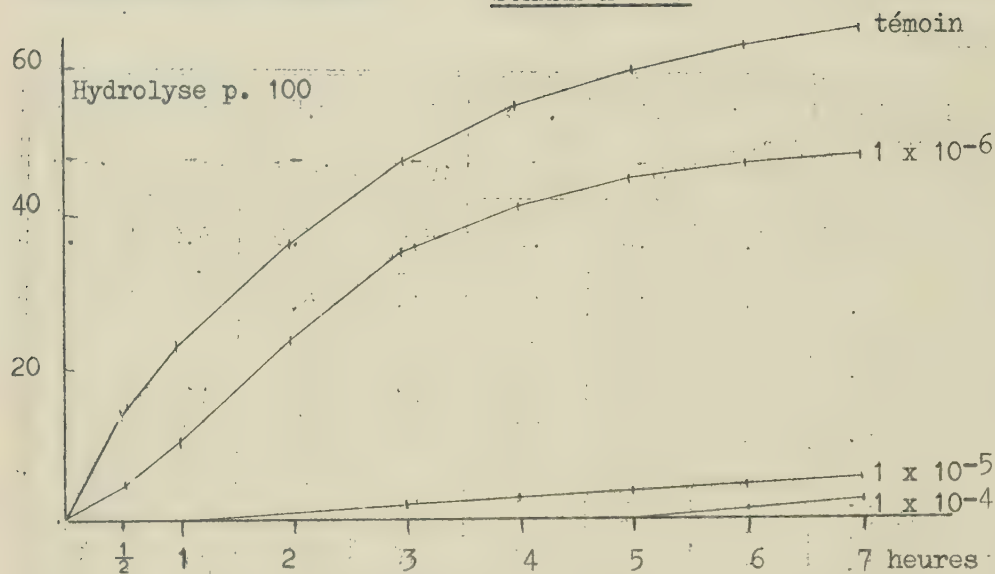
Aucun résultat ne figure dans le tableau n° 54 pour les concentrations 1×10^{-1} et $0,5 \times 10^{-1}$ qui élèvent par trop le pH au-dessus de 5,0 et pour lesquelles une coloration marron se développe après addition des deux gouttes de perchlorure de fer.

TABLEAU n° 54 -

Concentration finale en acétate de plomb		témoin	1 x 10^{-6}	1 x 10^{-5}	1 x 10^{-4}	1 x 10^{-3}	1 x 10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,1	5,2
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	14	13	14	14	13
	2 h.	39	39	39	38	39	38
	4 h.	57	56	57	57	57	55

- METAVANADATE d'AMMONIUM -

SCHEMA n° XIX -



- Influence du métavanadate d'ammonium -

TABLEAU n° 55 -

Concentration finale en métavanadate d'ammonium		témoin	1×10^{-8}	1×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	1/2 h.	14	13	13	4	0	0
	1 h.	23	22	22	10	0	0
	2 h.	36	36	34	24	1	0
	3 h.	47	46	46	35	2	0
	4 h.	54	54	53	41	3	0
	5 h.	58	58	56	44	3,5	0
	6 h.	61	60	59	46	4	1
	7 h.	63	61	61	47	4	2
% d'inhibition pour	1/2 h.	-	7	7	71	100	100
	1 h.	-	4	4	57	100	100
	2 h.	-	0	5	33	97	100
	3 h.	-	2	2	25	96	100
	4 h.	-	0	2	24	94	100
	5 h.	-	0	3	26	94	100
	6 h.	-	2	3	25	93	98
	7 h.	-	3	3	25	94	97

- MOLYBDATE D'AMMONIUM - $\text{Mo}^{7} \text{O}^{24} (\text{NH}^4)^6$, 4 H_2O R.P.

P.M. : 1236,2 MoO_3 % : 80 - 82

Quand la concentration en molybdate est supérieure à $0,5 \times 10^{-2}$ il se produit un trouble dès qu'on ajoute les deux gouttes de perchlorure de fer avant passage au photocolorimètre. C'est pour cette raison qu'aucun résultat relatif à ces concentrations n'est consigné dans les tableaux n° 56 et 56 bis, mais l'on peut supposer que l'inhibition est totale à ces teneurs en molybdate d'ammonium car alors on n'obtient aucune coloration violette.

TABEAU n° 56 -

Concentration finale en molybdate d'ammonium		témoin	1 x 10 ⁻¹¹	1 x 10 ⁻¹⁰	1 x 10 ⁻⁹	1 x 10 ⁻⁸	1 x 10 ⁻⁷
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	13	13	12,5	12	11,8	11,6
	1 h.	24	24	23	23	21	20
	2 h.	39,5	38,5	38	37	36	35
	3 h.	49	49	48	47	45	44
	4 h.	55	55	54	53	52	51
	5 h.	61	60	60	60	58	57
	6 h.	66	66	66	65	65	64
% d'inhibition pour	½ h.	-	0	4	7	9	11
	1 h.	-	0	4	4	12	16
	2 h.	-	2,5	4	6	9	11
	3 h.	-	0	2	4	8	10
	4 h.	-	0	2	4	5	7
	5 h.	-	1,5	1,5	1,5	5	6
	6 h.	-	0	0	1,5	1,5	3

TABEAU 56bis -

Concentration finale en molybdate d'ammonium		1 x 10 ⁻⁶	0,5 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵	0,5 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	11	8	4	0,5	0	0
	1 h.	19	15	10	2	1	0
	2 h.	33,5	24,5	18	4,5	2	1
	3 h.	42	31	26	8	3	1
	4 h.	50	37	32	11	5	2
	5 h.	56	44	40	16	8	3
	6 h.	62	53	49	22	12	5
% d'inhibition pour	½ h.	15	38	69	96	100	100
	1 h.	21	37	58	92	96	100
	2 h.	15	38	54	88	94	96
	3 h.	14	36	47	83	94	98
	4 h.	9	33	42	80	91	96
	5 h.	7	28	34	74	87	95
	6 h.	6	20	26	67	82	92

- TUNGSTATE DE SODIUM -

Tu 04 Na₂ , 2 H₂O P.M. = 330,03

Tu 03 % : 70 environ

Une triple raison nous a empêché de chiffrer l'inhibition de cet effecteur aux concentrations supérieures à $0,5 \times 10^{-3}$:

- 1°/- un trouble après addition du perchlorure de fer
- 2°/- un pH qui s'éloigne de plus en plus de 5,0 à mesure qu'augmente la teneur en tungstate.
- 3°/- une perturbation dans la réaction colorée au perchlorure.

- TABLEAU n° 57 -

Concentration finale en tungstate de sodium		témoin	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	2,5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻⁴
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	13	12	11,5	6	5	3
	1 h.	24	22	21	14	12	10
	2 h.	39	38	36	26	24	21
	3 h.	48	47	45	37	33	30
	4 h.	55	54	52	44	40	37
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	7	11	54	61	77
	1 h.	-	8	12	42	50	58
	2 h.	-	3	8	33	38	46
	3 h.	-	2	6	23	31	38
	4 h.	-	2	5	20	27	33

- PERCHLORURE DE FER -

Cl³Fe R.P. en solution Cl³Fe , 6H₂O

P.M. : 270,31 Densité : 1,26 - 1,28 Cl³Fe , 6 H₂O % : 50-52

Aux concentrations supérieures à $0,5 \times 10^{-3}$, le perchlorure communique au mélange réactionnel une très forte coloration qui ne permet pas de réaliser un témoin pour la lecture au photocolorimètre. De plus, toujours pour ces teneurs, il se produit un trouble qui augmente avec la concentration en perchlorure de fer.

TABLEAU n° 58 -

Concentration finale en perchlorure de fer		témoin	1 x 10 ⁻⁶	0,5 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	0,5 x 10 ⁻³
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	14	14	15	15	16
	2 h.	37	37	37	38	38	39
	4 h.	55	56	55	56	57	57

- ACETATE DE COBALT -

L'élévation du pH est trop forte quand on élève la concentration en acétate de cobalt au-dessus de 1×10^{-2} pour évaluer quantitativement l'influence de cet effecteur à ces teneurs.

- TABLEAU n° 59 -

Concentration finale en acétate de cobalt		témoin	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	$0,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,2	5,4
Hydrolyse p.100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	18	18	17	16	14
	2 h.	44	44	44	43	42	40
	4 h.	61	61	61	61	59	56

- ACETATE DE NICKEL -

Tant pour une question de pH qu'à cause d'une perturbation de la réaction colorée, nous n'avons pas pu voir l'influence des concentrations supérieures à 1×10^{-2} en acétate de nickel.

- TABLEAU n° 60 -

Concentration finale en acétate de nickel		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,3
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	15	14	15	15	15	10
	2 h.	39	40	40	39	39	29
	4 h.	55	55	55	54	55	45

De l'ensemble de ces résultats, se dégage cette constatation essentielle que la grande majorité des sels étudiés sont inhibiteurs. Deux métaux seulement, l'un et l'autre sous forme d'acétate et de nitrate se sont montrés activateurs dans des conditions voisines identiques. Les pourcentages d'hydrolyse après une heure d'incubation et relatifs à ces quatre sels sont exprimés en activité relative (le témoin = 100), dans le tableau n° 61.

Ainsi l'influence de ces sels à la concentration 1×10^{-3} se traduit par une activation de 32 à 44 p. 100 suivant qu'il s'agit du baryum ou de l'uranium ; le nitrate, tout comme l'acétate, n'ayant par eux-mêmes aucune action appréciable à cette concentration de 1×10^{-3} , nous sommes en droit (le pH n'ayant pas changé : 5,0) de reporter l'augmentation d'activité constatée au métal baryum ou uranium.

La question pourrait se poser au moins pour le baryum, de savoir si celui-ci n'est pas plutôt un anti-inhibiteur qu'un activateur véritable ; en effet, DODGSON et SPENCER (42), travaillant sur la sulfatase urinaire,

- TABLEAU n° 61 -

Effecteurs	Concentration finale en effecteur					
	Témoin	1 x 10 ⁻⁵	0,25x 10 ⁻⁴	0,5 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴	0,5 x 10 ⁻³
Acétate de baryum	100	100	100	100	108	123
Nitrate de baryum	100	100	-	-	107	-
Acétate d'uranium	100	100	100	-	130	135
Nitrate d'uranium	100	100	-	-	112	131
	1 x 10 ⁻³	2,5 x 10 ⁻³	0,5 x 10 ⁻²	1 x 10 ⁻²	0,25 x 10 ⁻¹	1 x 10 ⁻¹
Acétate de baryum	135	115	92	65	-	-
Nitrate de baryum	133	-	-	107	74	-
Acétate d'uranium	144	144	113	-	-	-
Nitrate d'uranium	132	-	54	23	0	0

ont mis en évidence une nette activation en présence de Cl^2Ba qu'ils interprètent par une précipitation des ions sulfates et phosphates présents dans le milieu et dont on connaît par ailleurs le fort pouvoir inhibiteur. Toutefois, ces auteurs font remarquer que cette double précipitation n'est vraiment complète qu'à un pH très alcalin : 11,5, et que, à pH 5,5, seuls les sulfates précipiteraient de façon appréciable. De la même manière, JAYLE et BEAULIEU (86) ajoutent systématiquement à l'urine 4 g. p. 100 ml de BaCl^2 après alcalinisation à pH 11,5, le précipité étant retenu et les urines ramenées à pH 5,0 pour le dosage ultérieur des 17-cétostéroïdes conjugués. D'autre part, nous n'avons constaté de précipitation véritable que dans le cas de l'acétate de baryum. Ainsi nous sommes donc amenés à penser qu'il s'agirait tant pour le baryum que pour l'uranium (d'autant plus que les sels minéraux d'uranyl sont solubles), d'une action activatrice véritable. Quant à l'effet inhibiteur manifesté par ces mêmes sels à des concentrations plus élevées, il est possible de discuter si cette inhibition relève plutôt (pour une part tout au moins) de l'anion correspondant (nitrates et acétates) que les métaux eux-mêmes.

Reste maintenant à envisager les sels dont la seule action effective se manifeste dans le sens d'une inhibition (le tableau n° 62 renferme les pourcentages d'inhibition dus à ces sels et relatifs à une heure d'incubation).

Si nous prenons le cas des acétates, nous constatons que l'acétate de potassium n'a aucun effet inhibiteur à 1×10^{-3} , pas plus que l'acétate de plomb, de nickel et de cobalt aux mêmes concentrations. Nous en déduisons donc que, selon toute vraisemblance, l'ion acétique n'a aucune action inhibitrice par lui-même et lorsque nous décelons une inhibi-

tion de 100 p. 100 avec l'acétate mercurique à la concentration 1×10^{-3} nous en déduirons que cet effet est à reporter à l'ion Hg^{++} lui-même et c'est d'ailleurs ce que nous confirme l'expérimentation pratiquée avec le chlorure mercurique pour lequel un effet inhibiteur très léger est déjà constaté à $0,5 \times 10^{-4}$ et atteint 71 p. 100 à $0,5 \times 10^{-3}$ et 100 p. 100 à $0,5 \times 10^{-2}$, alors qu'un chlorure (comme celui de sodium par exemple) ne manifeste aucune action appréciable à ces concentrations.

- TABLEAU n° 62 -

Effecteur	Concentration finale en effecteur											
	1×10^{-7}	1×10^{-6}	$0,5 \times 10^{-5}$	1×10^{-5}	$0,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	$0,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	$0,5 \times 10^{-1}$	1×10^{-1}
Citrate de lithium	0	0	0	0	0	0	0	10	-	-	-	-
Acétate de K	0	0	0	0	0	0	0	0	-	30	-	-
Sulfate de Cu	0	0	0	0	-	-	-	57	90	-	-	-
Nitrate d'argent	0	0	0	0	-	12	55	68	-	-	-	-
Nitrate de Mg	0	0	0	0	0	0	0	3	11	29	81	-
Chlorure de Sr	0	0	0	0	0	0	0	0	0	8	43	-
Sulfate de zinc	0	0	0	0	0	3	-	40	-	97	100	-
Acétate mercurique	-	0	-	0	-	26	-	100	100	-	-	-
Chlorure mercurique	0	0	0	0	8	20	71	-	100	-	-	-
Acétate de plomb	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
Métavanadate d'ammonium	4	57	-	100	-	100	-	-	-	-	-	-
Métamolybdate d'ammonium	16	21	37	58	92	96	-	100	-	-	-	-
Tungstate de Na	-	8	12	-	-	42	58	-	-	-	-	-
Perchlorure de fer	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-	-
Acétate de cobalt	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
Acétate de nickel	0	0	0	0	0	0	0	0	-	30	-	-

Par contre, le chlorure de strontium possédant le même effet inhibiteur que le chlorure de sodium, nous pouvons prêter au strontium le même rôle vis-à-vis de la "salicylsulfatase" que celui du sodium : faible inhibiteur.

En ce qui concerne les nitrates, dont nous avons vu précédemment que l'anion n'avait qu'un pouvoir inhibiteur très faible, si tant est qu'il en avait un, nous constatons un effet défavorable du $(NO_3)^2 Mg$ un peu supérieur à celui du nitrate de sodium ; par contre, le nitrate d'argent, déjà inhibiteur à 1×10^{-4} , nous autorise à croire que le métal Ag est inhibiteur pour la salicylsulfatase, le cation dans ce cas, contrairement à celui du nitrate de magnésium, jouant le rôle prépondérant.

Il est plus difficile d'interpréter l'action inhibitrice du sulfate de cuivre et du sulfate de zinc déjà très inhibiteurs à 1×10^{-3} le premier d'ailleurs un peu plus que le second. Il est fort probable que dans ce dernier cas, l'action inhibitrice de l'ion sulfate vient s'ajouter à celle habituelle des métaux lourds vis-à-vis de la plupart des processus enzymatiques.

Avec le tungstate de sodium, le métamolybdate d'ammonium et le métavanadate d'ammonium, nous nous trouvons en présence de trois sels fortement inhibiteurs, surtout les deux derniers et dont l'action défavorable est certainement due en majeure partie au complexe anionique de la molécule.

Enfin ayant commencé par l'examen de l'acétate de potassium, nous terminons par un autre sel organique, le citrate de lithium qui ne manifeste d'ailleurs qu'un effet antagoniste léger à partir de 1×10^{-3} , confirmant ainsi le rôle en quelque sorte indifférent ou presque, que nous avons déjà attribué aux sels organiques de métaux monovalents.

Sous réserve des recoupements que nous venons de faire, on peut par ordre de pouvoir d'inhibition décroissante, classer de la façon suivante les sels étudiés dans ce chapitre :

Métavanadate d'ammonium, métamolybdate d'ammonium, acétate mercurique, chlorure mercurique, tungstate de sodium, nitrate d'argent, sulfate de cuivre, sulfate de zinc, nitrate de magnésium, citrate de lithium, acétate de potassium, acétate de nickel, chlorure de strontium, perchlorure de fer, acétate de cobalt, acétate de plomb.

CHAPITRE XI

INFLUENCE DES EAUX MINÉRALES

Qu'il s'agisse des phénomènes prémonitoires qui s'effectuent dans le tube digestif, ou des phénomènes proprement dits de nutrition qui s'opèrent au niveau des tissus et des cellules, les véritables agents de ce travail biologique sont les diastases, dont CLAUDE BERNARD écrivait déjà en 1878 : "leur rôle dans les manifestation de la vie est d'une importance capitale.... , ce n'est pas trop s'avancer que de dire qu'elles contiennent, en définitive, le secret de la vie".

Or, les eaux minérales activent ou inhibent les processus diastatiques et cette action "zymosthénique" - positive ou négative - peut être considérable.

Si par exemple, on détermine in vitro la quantité d'amidon que l'amylase pancréatique est capable de transformer en sucre réducteur, suivant que, toutes conditions étant égales par ailleurs, la réaction s'opère en présence d'eau minérale ou en présence d'eau distillée, on voit que cette quantité peut être jusqu'à dix et douze fois plus forte dans le premier cas que dans le second. Pour chaque eau minérale, il sera possible de déterminer ainsi un "indice zymosthénique" vis-à-vis d'un ferment donné.

Il ne parait guère douteux que cette influence si puissante sur les enzymes, s'exerce également en partie in vivo et que l'on doive lui faire jouer un rôle dans le traitement hydro-minéral des maladies de la nutrition.

Notre intention n'est pas toutefois de reprendre ici cette question dans son ensemble. Nous renverrons pour ce faire à la thèse consacrée par DASTUGUE (30) à ce sujet et où se trouvent consignés, à côté de recherches personnelles, les travaux des premiers auteurs en la matière, à savoir : COURBIN (de Bagnère de Bigorre), LOEPER, MOUGEOT et AUBERTOT (de Royat). Mais, à côté de ces études d'ensemble, il y a intérêt chaque fois qu'une nouvelle diastase est mise en évidence, à examiner les répercussions possibles des eaux minérales sur son comportement et c'est ce que nous nous sommes proposés de faire en présence d'un nouvel enzyme plasmatique : la "salicylsulfatase".

Pour cela nous avons employé la technique habituelle avec la légère modification suivante : l'effecteur (eau minérale en l'occurrence) au lieu d'être introduit dans le milieu tampon acéto-acétique, rentre dans la dilution de S.D.H. préparée comme suit :

1 ml. S.D.H. + 9 ml. eau distillée + 90 ml. E.M. (eau minérale), ce qui donne une concentration finale du mélange réactionnel en E.M. de

45 p. 100. En diminuant la quantité d'eau minérale ajoutée au ml de S.D. H. et en augmentant l'addition d'E.D. pour compléter toujours à 100 ml. on réalise des concentrations de plus en plus faibles en E.M. (par exemple 25 p. 100, 10 p. 100, 5 p. 100, etc...).

Bien entendu on vérifie toujours le pH du mélange réactionnel à l'électrode de verre (pH 5,0 comme toujours).

Nous avons ainsi déterminé l'influence des eaux minérales suivantes :

La Bourboule (sources Choussy-Perrière, Clémence, Croizat, Fenestre), Le Mont-Dore (Bardon, César, Madeleine, Ramond), Vichy (Célestins), Salies-de-Béarn, Le Breuil (hydroxydase), Vittel (Gde Source), La Preste, Challes, Uriage, Enghien-les-Bains.

Nous avons ajouté à la fin de ce chapitre, le plasma de Quinton, qui, sans être une eau minérale à proprement parler, est une solution semi naturelle qui s'en rapproche beaucoup. Les eaux minérales prospectées sont classées dans ce chapitre de la façon suivante :

les eaux arsénicales : LA BOURBOULE

les eaux bicarbonatées sodiques : VICHY

les eaux bicarbonatées, siliceuses, arsénicales : LE MONT-DORE

les eaux chlorurées fortes : SALIES-de-BEARN

les eaux chlorurées mixtes : LE BREUIL

les eaux sulfatées calciques : VITTEL

les eaux sulfatées sodiques et magnésiennes : LA PRESTE

les eaux sulfureuses : CHALLES, URIAGE, ENGHIEU

Les moyennes de nos résultats relatifs à chacune des eaux minérales étudiées sont reportées dans les tableaux suivants :

(voir n° 63 à 79)

- TABLEAU n° 63 -

Concentration finale en E.M. "Choussy"		témoin	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	25	19	16	10,5	2,5	0,5
	1 h.	37	30	26	17	5	1
	2 h.	52	49	43	30	12	3
	3 h.	63	59	53	36	17	5
	4 h.	72	67	60	44	19	7,5
	5 h.	79	72	66	49	24	10
	6 h.	84	76	69	56	27	12,5
% d'inhibition pour	½ h.	-	24	36	58	90	98
	1 h.	-	19	30	54	86	97
	2 h.	-	6	17	42	77	94
	3 h.	-	6	16	43	73	92
	4 h.	-	7	16	39	73	90
	5 h.	-	9	16	38	70	87
	6 h.	-	9,5	18	33	68	85

- TABLEAU n° 64 -

Concentration finale en E.M. "Clémence"		témoin	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,1	5,3
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	14	13	11	9	4	1,5
	1 h.	23	21	18	15	9	4
	2 h.	37	34	32	28	18	9
	3 h.	48	46	42	38	24	13
	4 h.	54	51	48	45	31	17
	5 h.	60	57	55	51	38	21
% d'inhibition pour	½ h.	-	7	21	36	71	89
	1 h.	-	9	22	35	61	83
	2 h.	-	8	13	24	51	76
	3 h.	-	4	12	21	50	73
	4 h.	-	6	11	17	43	68
	5 h.	-	5	8	15	37	65

- TABLEAU n° 65 -

Concentration finale du tampon acétate		0,1 M						0,25 M	
Concentration fin. en E.M. "Croizat"		témoin	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mél. réact.		5,0	5,0	5,0	5,1	5,25	5,4	5,0	5,1
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	13	10	7	3,5	1	0,5	1,5	1
	1 h.	23	18	14	8,5	3	1,5	3,5	2,25
	2 h.	36	28	22	15	5,5	2,5	6	3,5
	3 h.	44	38	32	19	9,5	4	10	5
	4 h.	50	45	38	21,5	12,5	5,4	13	6,5
	5 h.	54	49	43	25	15	6,5	16	7,5
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	23	46	73	92	96	88	92
	1 h.	-	22	39	63	87	93	85	90
	2 h.	-	22	39	58	85	93	83	90
	3 h.	-	14	27	57	78	91	77	88
	4 h.	-	10	24	57	75	89	74	87
	5 h.	-	9	20	54	72	88	70	86

- TABLEAU n° 66 -

Concentration finale en E.M. "Fenestre"		témoin	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	14	14	14	12	9
	1 h.	22	22	21	21	18	14
	2 h.	36	36	36	35	30	24
	3 h.	46	46	44	43	39	31
	4 h.	53	53	51	51	45	35
	5 h.	59	59	58	57	51	39
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	0	0	14	36
	1 h.	-	0	4	4	18	36
	2 h.	-	0	0	3	16	33
	3 h.	-	0	4	6	15	32
	4 h.	-	0	4	4	15	34
	5 h.	-	0	2	3	14	34

- TABLEAU n° 67 -

Concentration finale en E.M. "Bardon"		témoin	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	15	13,5	13	11,5	9	6
	1 h.	23	22	21	19	15	11
	2 h.	37	36	35	32	26	19
	3 h.	46	45	44	40	35	26
	4 h.	55	54	53	48	42	32
	5 h.	60	59	58	55	46	37
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	10	13	23	40	60
	1 h.	-	4	9	17	35	53
	2 h.	-	3	5	14	30	49
	3 h.	-	2	4	13	24	43
	4 h.	-	2	4	13	23	42
	5 h.	-	1,5	3	8	23	38

- TABLEAU n° 68 -

Concentration finale en E.M. "César"		témoin	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,15
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	15	14,5	14	13	10	7
	1 h.	23	22	22	20	16	13
	2 h.	37	36	34	33	28	20
	3 h.	47	46	45	43	37	28
	4 h.	55	54	53	51	45	35
	5 h.	62	62	59,5	57	50	41
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	3	7	13	33	53
	1 h.	-	4	4	13	30	43
	2 h.	-	2,5	8	11	24	46
	3 h.	-	2	4	8	21	40
	4 h.	-	2	4	7	18	36
	5 h.	-	0	4	8	19	34

- TABLEAU n° 69 -

Concentration finale en E.M. "Madeleine"		témoin	2,5 p 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,1	5,2
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	13	13	11	7,5	5
	1 h.	24	23	22	21	17	12
	2 h.	36	35	34	32	26	18
	3 h.	44	43	42	39	34	25
	4 h.	53	51	50	46	41	30
	5 h.	59	58	56	54	48	36
	6 h.	66	65	65	62	56	43
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	7	7	21	46	64
	1 h.	-	4	8	12	29	50
	2 h.	-	3	6	11	28	50
	3 h.	-	2	4,5	11	23	43
	4 h.	-	4	6	13	23	43
	5 h.	-	2	5	8	19	39
	6 h.	-	1,5	1,5	6	15	35

- TABLEAU n° 70 -

Concentration finale en E.M. "Ramond"		témoin	2,5 p 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p 100	45 p 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	13	12	11	8	5
	1 h.	23	22	21	19	15	11
	2 h.	36	35	34	32	25	18
	3 h.	44	43	43	40	34	24
	4 h.	50	49	48	45	39	29
	5 h.	55	54	53	49	43	34
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	7	14	21	43	64
	1 h.	-	4	9	17	35	52
	2 h.	-	3	6	11	30	50
	3 h.	-	2	2	9	23	45
	4 h.	-	2	4	10	22	42
	5 h.	-	2	4	11	22	38

- TABLEAU n° 71 -

Concentration finale en E.M. Vichy "Célestins"		témoin	2,5 p 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	10	10	7,5	6	3	1,5
	1 h.	18	18	16	13	7	4
	2 h.	31	31	27	23	12	5,5
	3 h.	39	39	36	31	17	7
	4 h.	43	43	39	37	20	9,5
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	25	40	70	85
	1 h.	-	0	11	28	61	78
	2 h.	-	0	13	26	61	82
	3 h.	-	0	8	21	56	82
	4 h.	-	0	9	14	53	78

- TABLEAU n° 72 -

Concentration fin. en eaux mères de Salies-de-Béarn		tém.	0,05 p. 100	0,5 p. 100	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mél. réact.		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,9	4,8	4,6
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	20	19	11	3,5	2	0,5	0	0
	1 h.	30	29	20	6	2	1	0	0
	2 h.	46	46	34	13,5	7	3,5	2	1
	3 h.	55	55	44	20	10	5	3	2
	4 h.	62	61	53	26	14	8	4	3
% d'inhibit. pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	5	45	82	90	98	100	100
	1 h.	-	3	33	80	93	97	100	100
	2 h.	-	0	26	73	85	92	96	98
	3 h.	-	0	20	64	82	91	93	96
	4 h.	-	1	15	58	77	87	93	95

- TABLEAU n° 73 -

Concentration finale en eau du BREUIL		témoin	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p 100	25 p 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,1	5,2
Hydrolyse p. 100	$\frac{1}{2}$ h.	8	7,5	7	6	4	3
	1 h.	16	15,5	13,5	12	9	6
	2 h.	28	27,5	26,5	23	18	13
	3 h.	35	33	32	30	24	18
	4 h.	43	42	40	36	30	24
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	6	12	25	50	62
	1 h.	-	3	16	25	44	62
	2 h.	-	2	5	18	36	53
	3 h.	-	6	9	14	31	49
	4 h.	-	2	7	16	30	44

- TABLEAU n° 74 -

Concentration finale en E.M. Vittet "Gde Source"		Témoin	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	35 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	10	10	9	7	6	5,5
	1 h.	19	18	16,5	14,5	13,5	13
	2 h.	32	31	29	26	24	23
	3 h.	40	39	37	35	33	32
	4 h.	45	44	44	42	38	37
	5 h.	49	48	47	46	42	41
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	10	30	40	45
	1 h.	-	5	13	24	29	31
	2 h.	-	3	9	19	25	28
	3 h.	-	2,5	7,5	13	17	20
	4 h.	-	2	2	7	15	18
	5 h.	-	2	4	6	14	16

- TABLEAU n° 75 -

Concentration finale en E.M. "La Preste"		témoin	2,5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	35 p 100	45 p 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	13	13	12	10,5	9	8
	1 h.	20,5	20	20	17	16	13
	2 h.	33	32	31,5	27	25	22
	3 h.	41	41	40	37,5	35	32
	4 h.	46	46	45	42	39	36
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	6	19	28	39
	1 h.	-	2	2	17	23	36
	2 h.	-	3	5	18	24	33
	3 h.	-	0	2,5	8	15	22
	4 h.	-	0	2	9	15	22

- TABLEAU n° 76 -

Concentration finale en E.M. de "Challes"		témoin	2,5 p. 100	5 p. 100	20 p. 100	30 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	11	11	10	8	7	5
	1 h.	20	20	19	16,5	14	13
	2 h.	33	33	31	27	25	23
	3 h.	41	41	40	36	33	30
	4 h.	49	49	48	44	41	38
	5 h.	54	54	53	49	46	43
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	9	25	36	54
	1 h.	-	0	5	17	30	35
	2 h.	-	0	6	18	24	30
	3 h.	-	0	2,5	12	20	27
	4 h.	-	0	2	10	16	22
	5 h.	-	0	2	9	13	20

- TABLEAU n° 77 -

Concentration finale en eau d'Uriage		témoin	0,1 p 100	1 p 100	5 p 100	25 p 100	45 p 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	12	11,7	10	6	1,7	1
	1 h.	20	19,5	18	13	4	2
	2 h.	35	34	32	24	11	5,5
	3 h.	44	42	40	32	14	8
	4 h.	50	49	48	40	20	12
	5 h.	55	54	53	45	24	15
% d'inhibition pour	½ h.	-	3	16	50	86	92
	1 h.	-	2,5	10	35	80	90
	2 h.	-	3	9	31	68	84
	3 h.	-	5	9	27	68	82
	4 h.	-	2	4	20	60	76
	5 h.	-	2	4	18	56	73

- TABLEAU n° 78 -

Concentration finale en eau E.M. d'Enghien		témoin	2,5 p 100	5 p 100	10 p 100	25 p 100	45 p 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	11	10,5	10	9,5	7	6
	1 h.	19	18	17	16	13,5	12
	2 h.	31	30	29	28	25	23
	3 h.	38	37	36	36	32	30
	4 h.	46	45	44,5	43	39	38
	5 h.	52	51	50	49	44	43
% d'inhibition pour	½ h.	-	5	9	14	36	45
	1 h.	-	5	10	15	29	37
	2 h.	-	3	6	10	19	26
	3 h.	-	2,5	5	5	16	21
	4 h.	-	2	3	6	15	17
	5 h.	-	2	4	6	15	17

- TABLEAU n° 79 -

Concentration finale en plasma Quinton		témoin	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	10	8	7	6	4	2
	1 h.	20	19	17	14	10	6
	2 h.	28	27,5	26	23	17	11
	3 h.	38	37	34	31	23	17
	4 h.	45	45	42	39	31	23
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	20	30	40	60	80
	1 h.	-	5	15	30	50	70
	2 h.	-	2	7	18	40	61
	3 h.	-	2,5	10	18	39	55
	4 h.	-	2	9	15	33	50

Nous avons réuni dans le tableau n° 80 les pourcentages d'inhibition des eaux minérales étudiées dans ce chapitre et relatifs à une heure d'incubation à 37° C.

- TABLEAU n° 80 -

Effecteurs	Concentration finale en effecteur				
	2,5 p. 100	5 p. 100	10 p. 100	25 p. 100	45 p. 100
LA BOURBOULE (Choussy-Perrière)	19	30	54	86	97
LA BOURBOULE (Clémence)	9	22	35	61	83
LA BOURBOULE (Croizat)	22	39	63	87	93
LA BOURBOULE (Penestre)	0	4	4	18	36
LE MONT DORE (Bardon)	4	9	17	35	53
LE MONT DORE (César)	4	4	13	30	43
LE MONT DORE (Madeleine)	4	8	12	29	50
LE MONT DORE (Ramond)	4	9	17	35	52
VICHY (Célestins)	0	11	28	61	78
SALIES-de-BEARN	80	93	97	100	100
LE REUIL (hydroxydase)	3	16	25	44	62
VITTEL (Gde Source)	5	13	24	29	31
LA PRESTE	2	-	2	17	36
CHALLES	0	5	10	25	35
URIAGE	3	10	35	80	90
ENGHIEN	5	10	15	29	37
PLASMA de QUINTON	5	15	30	50	70

Dans l'interprétation de ces résultats, les variations de l'acide ionique ne sauraient prendre place puisque nous avons travaillé constamment en milieu tampon et qu'aucune variation de pH du milieu réactionnel n'a été constatée ; il y aurait donc lieu de mettre en avant l'action des sels minéraux renfermés dans ces eaux et dont nous avons pu montré antérieurement, pour quelques-uns tout au moins, l'effet inhibiteur à des concentrations comparables : carbonate acide de sodium, sulfate de sodium, sulfure de sodium, chlorure de sodium à forte concentration, etc....

Mais une telle recherche ne serait être poussée extrêmement loin : les travaux d'hydrologie expérimentale nous ont montré depuis longtemps qu'il fallait considérer une eau minérale comme un tout et qu'il était habituellement assez vain de vouloir reporter telle ou telle action thérapeutique à un seul de ses composants physicochimiques qui ne pourrait donc être considéré isolément que par artifice.

Nous précisons également que nous avons travaillé sur des eaux embouteillées du commerce ou sur des eaux prises au griffon, mais qui n'ont pas été maintenues rigoureusement à l'abri de l'oxygène de l'air suivant le procédé bien mis au point par Madame BLANQUET et ARMAND (13).

Sans revenir sur la question de la floculation des eaux minérales largement étudiées au point de vue physicochimique par Madame BLANQUET (12) et du point de vue biologique par DODEL et DASTUGUE (37), nous signalerons que la seule eau minérale non floculée dans le commerce se trouve être la source du BREUIL.

Sous ces différentes réserves, nous pouvons classer les eaux minérales précédemment expérimentées par ordre d'inhibition décroissante de la façon suivante : Salies-de-Béarn, Croizat, Choussy-Perrière, Clémence, Célestins, Uriage, Bardon, Ramond, Plasma de Quinton, Madeleine, César, Enghien, Hydroxydase, Fenestre, Challes, Vittel (Gde Source, La Preste.

CHAPITRE XII

INFLUENCE DES ANTICOAGULANTS

Nous avons recherché le pouvoir antisalicylsulfatasique éventuel des anticoagulants employés couramment, soit in vitro. C'est ainsi que nous avons déterminé le degré d'inhibition produit sur la "salicylsulfatase" par les anticoagulants suivants : Fluorure de sodium; citrate de lithium, oxalate de sodium, héparine et Lique[®]le*.

- FLUORURE DE SODIUM - (voir chapitre IX) -

- CITRATE DE LITHIUM - (voir chapitre X) -

- OXALATE DE SODIUM - P.M. 134 -

La concentration 1×10^{-1} n'a pu être réalisée, car à cette teneur, l'oxalate de sodium est insoluble dans le tampon acéto-acétique. De plus, avec la concentration $0,5 \times 10^{-2}$ nous avons dû faire un témoin car il apparaît alors une coloration jaune après addition du perchlorure de fer qui vient se superposer à la coloration violette habituelle.

TABIEAU n° 81 -

Concentration finale en oxalate de sodium		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	$0,5 \times 10^{-2}$
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	15	15	15	15	6	0
	1 h.	27	27	27	27	12	1
	2 h.	43	42	43	43	23	5
	3 h.	53	53	54	53	30	9
	4 h.	58	58	58	58	35	12
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	0	0	60	100
	1 h.	-	0	0	0	55	96
	2 h.	-	2	0	0	47	88
	3 h.	-	0	0	0	43	83
	4 h.	-	0	0	0	40	79

- HEPARINE -

Nous avons introduit l'héparine sous forme de liquémine "ROCHE" dont 1 ml correspond à cinq mille U.I. (cinq centigrammes). Au-dessus de la concentration $0,5 \times 10^{-4}$, il se produit un trouble dans le mélange réactionnel et surtout quand on ajoute les deux gouttes de perchlorure

de fer. Si, malgré tout, nous n'avons pu chiffrer l'inhibition à ces teneurs en héparine, il semble bien qu'à partir de ce moment l'intensité de la coloration violette diminue à mesure qu'augmente la quantité de cet effecteur.

TABLEAU n° 82 -

Concentration finale en héparine		témoin	0,5 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁶	0,5 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵	0,5 x 10 ⁻⁴
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	15	15	14	15	16	15
	2 h.	37	37	38	37	37	38
	4 h.	55	55	54	55	54	54

- LIQUOÏDE * - (Polyanétholsulfonate de potassium) -

Nous avons employé du "liquoïde Roche". Aucune concentration supérieure à 1×10^{-4} ne figure au tableau 83, car il se produit alors un trouble quand on ajoute les deux gouttes de Fe Cl_3 avant passage au photocolorimètre ; mais si l'influence du Liquoïde* n'a pu être précisé d'une façon quantitative, il semble bien que ce produit inhibe l'activité salicylsulfatasique quand on l'ajoute en forte proportion dans le mélange réactionnel.

TABLEAU n° 83 -

Concentration finale en Liquoïde *		témoin	1 x 10 ⁻⁶	0,5 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁵	0,5 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	18	18	17	17	18	17
	2 h.	44	43	44	44	45	44
	4 h.	61	60	60	61	61	60

TABLEAU n° 84 -

Effecteur	Concentration finale en effecteur						
	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	0,5 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	0,5 x 10 ⁻²	1 x 10 ⁻²
Fluorure de Na	7	50	-	97	100	-	100
Oxalate de Na	0	0	0	-	55	96	-
Citrate de lithium	0	0	0	0	9	-	-
Héparine	0	0	0	0	-	-	-
Liquoïde*	0	0	0	0	-	-	-

Le tableau 84 (page précédente) récapitule les pourcentages d'inhibition après une heure d'incubation à 37° C et relatifs à différentes concentrations des quelques anticoagulants expérimentés ci-dessus.

Il en résulte que les "décalcifiants" , type fluorure ou oxalate, employés couramment comme anticoagulants in vitro inhibent de façon très marquée la salicylsulfatase, ce phénomène étant encore plus accentué pour le fluorure que pour l'oxalate. L'inhibition provoquée par le citrate de lithium (à défaut du citrate de sodium que nous n'avons pas employé) est beaucoup plus faible.

Quant à l'héparine et au Liquoïde* , leur incidence est nulle à des doses qui, par elles-mêmes, sont faiblement anticoagulantes.

CHAPITRE XIII

INFLUENCE DES AGENTS MOUILLANTS

Les agents mouillants ou corps tensio-actifs possèdent dans leur molécule deux ordres de groupements à propriétés opposées : des groupements hydrophobes et lipophiles et des groupements hydrophiles et lipophobes qui peuvent être ionisables ou non. Suivant la charge du groupement hydrophile ou groupe "polaire", on classera les agents mouillants en :

1°/- non ioniques, sans groupe ionisable.

2°/- anioniques, avec un groupement hydrophile -

3°/- cationiques, avec un groupement hydrophile +

C'est cet ordre que nous adopterons dans ce chapitre.

- TWEEN 20* - (non ionique) -

Avec les concentrations 1×10^{-2} et 1×10^{-1} il se produit un trouble après addition du perchlorure de fer, aussi nous n'avons porté dans le tableau 85 aucun résultat relatif à ces teneurs en Tween 20*.

TABLEAU n° 85 -

Concentration finale en Tween 20*		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	17	17	18	18	17	17
	2 h.	42	41	41	41	42	41
	4 h.	54	55	55	54	54	55

- TAUROCHOLATE DE SODIUM - (anionique) -

Un précipité se produit après addition du Fe Cl_3 dans tous les tubes renfermant une concentration en cet effecteur supérieur à 1×10^{-2} .

TABLEAU n° 86 -

Concentration finale en taurocholate de Na		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	17	18	18	17	17
	2 h.	44	45	45	44	44	44
	4 h.	60	60	60	61	61	61

- B.D.A. - Bromure de dodécyl-diméthyl carbéthoxy-méthyl ammonium à 50 p. 100 (cationique) -

Au dessus d'une concentration supérieure à $0,5 \times 10^{-3}$, toute appréciation de l'influence du B.D.A. ne peut être évaluée à cause de l'apparition d'un trouble après addition du perchlorure de fer.

TABLEAU n° 87 -

Concentration finale en B.D.A.		témoin	$0,5 \times 10^{-5}$	1×10^{-5}	$0,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	16	15	16	16	15	16
	1 h.	42	42	41	41	43	42
	4 h.	57	58	57	57	58	57

- UVELINE* - méthylsulfate de N-méthyl 8-hydroxyquinoléinium (cationique).

Il a été nécessaire, pour les concentrations les plus élevées de cet effecteur, de réaliser des gammes étalons propres à chaque teneur en uvéline et faire des témoins chaque fois.

TABLEAU n° 88 -

Concentration finale en Uvéline*		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	$2,5 \times 10^{-3}$	$2,5 \times 10^{-2}$
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	4,9	4,8
Hydrolyse p. 100 p. 100	$\frac{1}{2}$ h.	18	17	17	18	19	20
	2 h.	42	42	41	42	43	42
	4 h.	58	58	58	57	59	59

- BENZODODECINIUM* - Chlorure de di-méthylbenzyl dodécyl ammonium (cationique).

Au-dessus de la concentration 1×10^{-3} , l'effet tampon du milieu acéto-acétique n'est pas suffisant pour maintenir à pH 5,0 le mélange réactionnel, aussi, les baisses d'activité "salicylsulfatasiques" constatées à ces teneurs en benzododecinium peuvent être (et doivent même) être motivées par ces variations de l'acidité ionique.

TABLEAU n° 89 -

Concentration finale en benzododecinium*		témoin	1×10^{-5}	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	$0,5 \times 10^{-2}$
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,8
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	18	17	18	18	9
	2 h.	41	40	41	41	41	20
	4 h.	55	55	54	55	55	28

BIOCIDAN* - Bromure de N cétyl-diméthyl 1-cyclohexanol 2 ammonium.

Le pH devient par trop défavorable pour les concentrations supérieures à 1×10^{-3} et nous a empêché d'examiner l'influence de ces teneurs en biocidan*.

TABLEAU n° 90 -

Concentration finale en biocidan*		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	> 5,4
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	15	14	14	14	7
	2 h.	38	37	38	38	37	20
	4 h.	55	55	54	55	55	32

CETAVLON* - Bromure de céthyl-triméthyl ammonium.

Pour cet effecteur, les concentrations supérieures à 1×10^{-3} perturbent trop l'acidité ionique pour permettre d'apprécier quantitativement l'influence du cetavlon* à ces teneurs.

TABLEAU n° 91 -

Concentration finale en cetavlon*		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,2	5,4
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	18	18	18	17	15
	2 h.	44	45	44	45	43	40
	4 h.	61	60	61	61	59	56

DESOGÈNE* - C'est une solution à 10 p. 100 de méthosulfate de méthyl dodécyl triméthyl ammonium.

L'apparition d'un trouble après addition des deux gouttes de perchlorure de fer pour les concentrations en désogène supérieures à 1×10^{-3} est un obstacle pour chiffrer l'influence des fortes teneurs en cet effecteur.

TABLEAU n° 92 -

Concentration finale en désogène*		témoin	1×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	16	15	16	16	15	16
	2 h.	42	42	41	42	42	42
	4 h.	58	58	58	57	58	57

En définitive, les agents mouillants dont l'action pharmacodynamique est si importante dans un très grand nombre de circonstances (perméabilité des membranes, action bactériolytique, etc...) ne manifestent aux doses où nous avons pu les employer (c'est-à-dire la plupart du temps de $0,5 \times 10^{-5}$ à $0,5 \times 10^{-3}$ ou 1×10^{-3}) aucun effet appréciable sur l'activité de la salicylsulfatase.

Aux doses supérieures, nous nous sommes trouvé en présence de phénomènes d'insolubilité (Tween 20*, B.D.A.) ou bien il s'est agit de produits déterminant une modification marquée de l'acidité ionique (tel fut le cas du benzododecinium).

CHAPITRE XIV

INFLUENCE DE QUELQUES ALCALOÏDES ET SUBSTANCES ASSIMILÉES

- HEROÏNE - (chlorhydrate de diacétylmorphine) -

TABLEAU n° 93 -

Concentration finale en héroïne		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,5 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,3	5,5
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	17	17	17	18	21	21
	1 h.	29	29	29	29	32	32
	2 h.	43	43	44	45	45	45
	3 h.	50	50	50	50	53	53
	4 h.	55	55	55	55	58	58
%	½ h.	-	0	0	6	23	23
	1 h.	-	0	0	0	10	10
	2 h.	-	0	2	5	5	5
	3 h.	-	0	0	0	6	6
	4 h.	-	0	0	0	5	5

Nous constatons une très légère activation aux concentrations 1 x 10⁻² et 0,5 x 10⁻¹ pour lesquelles le pH n'est pourtant pas optimum.

- MORPHINE - (Chlorhydrate de)

TABLEAU n° 94 -

Concentration finale en morphine		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	2,5 x 10 ⁻²
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,4	5,6
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	17	17	17	18	19	20
	2 h.	44	43	44	45	47	49
	4 h.	61	61	61	62	65	67

Une certaine activation se produit pour des teneurs en morphine qui communiquent pourtant un pH défavorable à la réaction enzymatique.

COCAÏNE - (méthylbenzoylecgonine), (chlorhydrate)

Pour la concentration 0,5 x 10⁻¹ le pH du mélange réactionnel s'élève à 5,4 que l'on sait être légèrement inhibiteur.

TABLEAU n° 95 -

Concentration finale en cocaïne		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,5 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,4
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	17	18	17	17	16	13
	2 h.	43	43	43	42	43	32
	4 h.	60	60	61	60	59	49

- PROCAINE - (chlorhydrate de para-aminobenzoyldiéthylamino-éthanol) -

TABLEAU n° 96 -

Concentration finale en procaïne		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	1 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	18	17	18	18	18	17
	2 h.	44	44	44	43	44	44
	4 h.	61	61	61	60	60	60

- LIGNOCAINE - (chlorhydrate de) : (xylocaïne) -

TABLEAU n° 97 -

Concentration finale en lignocaïne		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,5 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,1	5,6
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	16	16	16	16	13	9
	2 h.	41	40	41	41	38	29
	4 h.	58	58	57	58	55	45

- DIHYDRO-OXY-CODEINONE - (Chlorhydrate de)

TABLEAU n° 98 -

Concentration finale en dihydrooxycodéinone		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,5 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,1	5,5
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	18	18	17	18	16	13
	2 h.	44	44	43	44	41	33
	4 h.	61	60	61	61	58	48

- ESERINE - (sulfate de)

C'est au sulfate de cet alcaloïde que nous nous sommes adressé.

TABEAU n° 99 -

Concentration finale en éserine		témoin	5 x 10 ⁻⁶	5 x 10 ⁻⁵	5 x 10 ⁻⁴	5 x 10 ⁻³	5 x 10 ⁻²
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,2	5,9
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	14	14	14	11	1,5	1
	1 h.	26	26	26	21	4	2
	2 h.	44	44	44	37	10	4
	3 h.	51	51	51	46	14	6
	4 h.	56	56	56	50	21	9
% d'inhibition pour	½ h.	-	0	0	21	89	93
	1 h.	-	0	0	19	84	92
	2 h.	-	0	0	16	77	91
	3 h.	-	0	0	10	72	88
	4 h.	-	0	0	11	62	84

- ANTIPYRINE - (Phényl-1-diméthyl-2-3 isopyrazolone) -

Avec cet effecteur, on obtient après addition des deux gouttes de perchlorure de fer, une coloration rose puis rouge d'autant plus intense que la concentration en antipyrine augmente : d'où la nécessité de réaliser des témoins pour chaque lecture au photocolorimètre. Toutefois, l'intensité de la coloration rouge devient telle pour les concentrations 1×10^{-1} et $0,5 \times 10^{-1}$ qu'il est impossible de faire la lecture de leurs témoins et de ce fait, nous avons dû abandonner l'étude de l'influence de ces teneurs en antipyrine.

TABEAU n° 100 -

Concentration finale en antipyrine		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	0,5 x 10 ⁻²	1 x 10 ⁻²
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	16	16	17	16	15	16
	2 h.	44	45	44	44	45	44
	4 h.	62	61	62	61	61	61

- CHLORPROMAZINE (Largactil*) -

Avec des concentrations supérieures à 1×10^{-4} , il se développe une coloration rouge après addition du Fe Cl_3 qui empêche toute appréciation d'activité enzymatique.

TABLEAU n° 101 -

Concentration finale en chlorpromazine		témoin	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	0,5 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻³
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	19	18	18	17	19	18
	2 h.	45	44	45	45	45	44
	4 h.	60	61	61	60	60	61

Nous avons récapitulé dans le tableau n° 102 les activités "relatives" constatées pour une heure d'incubation et vis-à-vis des différents effecteurs étudiés dans ce chapitre (l'activité pour le témoin est 100, en dessous, il y a inhibition et au-dessus, activation).

TABLEAU n° 102 -

Effecteur	Concentration finale en effecteur					
	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,5 x 10 ⁻¹	1 x 10 ⁻¹
Héroïne (chlorhydrate)	100	100	100	100	110	110
Morphine (chlorhydrate)	100	100	102	107	110	-
Cocaïne (chlorhydrate)	100	100	100	100	-	-
Procaine (chlorhydrate)	100	100	100	100	100	100
Lignocaïne (chlorhydrate)	100	100	100	94	-	-
Chlorhydrate de dihydro-oxy-codéine	100	100	100	93	-	-
Esérine (sulfate)	100	100	50	20	-	-
Antipyrine	100	100	100	100	-	-
Largactil*	100	100	100	-	-	-

A l'examen du tableau 102, nous voyons donc que les alcaloïdes étudiés ne modifient que fort peu la réaction enzymatique. Tout au plus peut-on noter une légère activation avec des doses relativement fortes ($0,5 \times 10^{-1}$) d'héroïne et de morphine, ou des inhibitions également peu accentuées pour la lignocaïne et la dihydro-oxy-codéine à des concentrations du même ordre de grandeur. Une exception serait peut-être à faire à première vue pour le sulfate d'ésérine dont l'inhibition est de 50 p. 100 à 1×10^{-3} , mais nous connaissons par ailleurs l'action du sulfate de sodium qui inhibe à 50 p. 100 pour une concentration identique et de plus le même sulfate d'ésérine est indifférent à 1×10^{-4} .

Nous pouvons donc affirmer que l'ésérine, comme les autres alcaloïdes envisagés, n'a pas d'effet inhibiteur appréciable. Cette constatation est d'autant plus importante que l'on connaît le pouvoir anti-estérasique habituellement très marqué de l'ésérine ; c'est ainsi que cet alcaloïde, à des dilutions de l'ordre de 1 p. 5.000.000, protège complètement l'acétylcholine des effets destructeurs de la cholinestérase (61-32).

De même, en 1940, DASTUGUE et MATHON (32) d'une part, et HAZARD (75) d'autre part, montrèrent que l'ésérine inhibe de 50 p. 100 la procaïnestérase à la concentration de 1×10^{-7} .

Au contraire, dans le cas de l'aspirinestérase, il faut atteindre une concentration de 1 p. 20.000 pour obtenir une inhibition de 25 p. 100 (34) et plus encore dans le cas de la " myrosulfatase " de la moutarde noire sur laquelle une concentration de 1 p. 1.000 n'a aucune action.

L'on peut donc classer d'après ces travaux, les estérases en diastases ésérino-sensibles et ésérino-résistantes. Il n'est donc pas sans intérêt de constater que la salicylsulfatase ne présente aucune sensibilité vis-à-vis de l'action de l'ésérine.

CHAPITRE XV

INFLUENCE DE DIVERS ANTIBIOTIQUES et de QUELQUES SUBSTANCES ASSIMILEES

ACTINOMYCINE -

Nous avons utilisé des flacons d'actinomycine SPECIA pour injection intraveineuse et renfermant :

actinomycine C 200 μ g.
saccharose q. s. p. 200 mg.

TABLEAU n° 103 -

Concentration finale en actinomycine*		témoin	0,01 μ g p.100 cc	0,1 μ g p.100 cc	1 μ g p.100 cc	10 μ g p.100 cc	100 μ g p.100 cc
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	15	14	15	15	14	15
	2 h.	41	41	40	41	42	41
	4 h.	57	58	57	57	58	57

- DIDROMYCINE - (dihydrostreptomycine) -

Cet effecteur a été expérimenté sous deux formes différentes : base et sulfate.

-DIDROMYCINE (dihydrostreptomycine base) - nous nous sommes adressé à la Dihydromycine SPECIA en flacon de 4 ml (solution à 25 %).

TABLEAU n° 104 -

Concentration finale en didromycine (base)		témoin	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	2 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,25 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,2	5,4
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	16	11	1	0	0	0
	1 h.	23	18	2	1	0	0
	2 h.	37	32	6	2	0	0
	3 h.	47	42	9	4	0	0
	4 h.	54	49	12	6	0	0
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	31	94	100	100	100
	1 h.	-	22	91	96	100	100
	2 h.	-	13	84	94	100	100
	3 h.	-	11	81	91	100	100
	4 h.	-	9	77	89	100	100

- DIDROMICYNE (sulfate de) -

Nous avons utilisé la didromycine RHONE-POULENC sous forme de poudre blanche.

TABLEAU n° 105 -

Concentration finale en didromycine (sulfate)		témoin	0,01 p 1000	0,1 p 1000	1 p 1000	10 p 1000	50 p 1000
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,1	5,3
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	19	18	17,5	11	1,5	0
	1 h.	28	28	26	17	3	0,25
	2 h.	42	42	40	31	7	1
	3 h.	50	50	50	39	11	1
	4 h.	55	55	54	43	14	1,5
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	5	7	42	92	100
	1 h.	-	0	7	39	89	99
	2 h.	-	0	5	26	83	97
	3 h.	-	0	0	22	78	98
	4 h.	-	0	2	22	74	97

- ISONIAZIDE -

TABLEAU n° 106 -

Concentration finale en isoniazide		témoin	1 x 10^{-6}	1 x 10^{-5}	1 x 10^{-4}	1 x 10^{-3}	1 x 10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,2
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	18	17	18	18	16
	2 h.	44	43	44	44	44	43
	4 h.	56	55	56	56	55	54

- SULFANILAMIDE -

Une insuffisance de solubilité nous a empêché de réaliser des concentrations supérieures à 1×10^{-3} .

TABLEAU n° 107 -

Concentration finale en sulfanilamide		témoin	0,05 x 10^{-4}	0,1 x 10^{-4}	0,1 x 10^{-4}	1 x 10^{-4}	10 x 10^{-4}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	1 h.	23	23	23	23	23	20
	3 h.	47	47	47	46	47	44
	5 h.	59	59	59	58	59	56

- GANTRISINE* - (3,4 - Diméthyl - 5 - sulfamide - isoxazol) -

L'effecteur ne peut être introduit directement dans le tampon acéto-acétique à cause d'une précipitation qui se produit alors. Aussi l'avons-nous mis dans la préparation enzymatique. Lors du mélange à volume égal du tampon (sans gantrisine) et de la dilution de S.D.H. (contenant la gantrisine) nous ne constatons ni précipité, ni trouble.

TABLEAU n° 108 -

Concentration finale en Gantrisine ROCHE		témoin	0,025 p. 1000	0,05 p. 1000	0,1 p. 1000	0,2 p. 1000	0,4 p. 1000	2 p. 1000	20 p. 1000
pH du mélange réact.		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1	5,3
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	15	15	15	13	11	9	2	0
	1 h.	27	26	26	23	21	18	7	1
	2 h.	41	41	41	38	35	30	12	2
	3 h.	51	50	50	46	43	37	16	3
	4 h.	59	58	58	55	52	47	23	3,5
% d'inhibition pour	½ h.	-	0	0	13	27	40	87	100
	1 h.	-	3	3	15	22	33	74	96
	2 h.	-	0	0	7	15	27	71	95
	3 h.	-	2	2	10	16	27	69	94
	4 h.	-	1,5	1,5	7	12	20	61	94

- SOLUMEDINE* - (sulfamérazine) ou p. amino-phényl-sulfamido-méthyl-pyrimidine).

Vue l'impossibilité qu'il y a à dissoudre plus de 5×10^{-4} de soluméidine* dans le tampon acétique, nous introduisons l'effecteur dans la dilution de S.D.H. (c'est-à-dire que nous diluons le suc digestif d'Hélix avec une solution de soluméidine).

TABLEAU n° 109 -

Concentration finale en soluméidine*		témoin	2,5 x 10-4	5 x 10-4	7,5 x 10-4	10 x 10-4	50 x 10-4
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	15	11	8	5	3	1
	1 h.	26	20	14	9	6	2
	2 h.	43	37	33	30	19	5
	3 h.	52	47	39	32	21	7
	4 h.	58	54	43	34	23	8
% d'inhibition pour	½ h.	-	26	46	66	80	93
	1 h.	-	23	46	65	77	92
	2 h.	-	14	23	30	59	79
	3 h.	-	10	25	39	60	86
	4 h.	-	7	26	41	60	86

- SOLUFONTAMIDE* - (p. amino-phényl-sulfonyl-thiourée).

C'est une solution à 33 % du sel du triéthanol amine de la sulfathiourée. Tant pour une question de pH que pour des interférences de coloration, nous n'avons pas pu apprécier l'influence des concentrations supérieures à 1×10^{-3} .

TABLEAU n° 110 -

Concentration finale en solufontamide*		témoin	1×10^{-7}	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,1
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	16	16	16	9	3	1
	1 h.	26	26	26	14	4	1
	2 h.	43	43	43	22	5	2
	3 h.	53	53	53	31	9	3
	4 h.	58	58	58	36	12	5
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	0	44	81	94
	1 h.	-	0	0	46	84	96
	2 h.	-	0	0	49	88	95
	3 h.	-	0	0	41	83	94
	4 h.	-	0	0	38	79	91

Dans le tableau 111 figurent les pourcentages d'inhibition dus aux différents effecteurs étudiés dans ce chapitre (et cela pour une incubation à 37° C pendant une heure).

TABLEAU n° 111 -

Effecteur	Concentration finale en effecteur											
	1×10^{-7}	1×10^{-6}	$0,5 \times 10^{-5}$	1×10^{-5}	$0,5 \times 10^{-4}$	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	$0,5 \times 10^{-2}$	1×10^{-2}	2×10^{-2}	$0,5 \times 10^{-1}$
Didromycine (base)	-	-	-	-	-	22	-	91	98	100	-	-
Didromycine (sulfate)	0	0	0	0	-	7	-	39	-	89	-	99
Isoniazide	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-
Sulfanilamide*	0	0	0	0	0	0	-	6	-	-	-	-
Gantrisine*	0	0	0	3	3	15	33	-	74	-	96	-
Solumédine	-	-	-	-	-	-	46	77	92	-	-	-
Solufontamide*	0	0	-	46	-	84	-	96	-	-	-	-

A l'examen de ce tableau d'ensemble, nous voyons donc que les antibiotiques (et substances assimilées) expérimentés se divisent en deux catégories :

Ceux dont l'action inhibitrice est nulle ou pratiquement nulle : isoniazide et sulfanilamide,

Ceux dont l'action est fortement inhibitrice, en particulier la solufontamide* (près de 50 p. 100 d'inhibition à 1×10^{-5}) et à un degré un peu moindre, la gantrisine*, la solumédine* et la didromycine.

Dans le cas de la didromycine, on remarquera d'ailleurs qu'à égalité de concentration globale, le sulfate est moins inhibiteur que la base, malgré l'action inhibitrice des sulfates.

En ce qui concerne les sulfamides, la molécule la plus simple (sulfanilamide) est la moins inhibitrice et l'introduction de tout radical étranger, qu'il s'agisse du cas de la solumédine*, de la gantrisine* ou de la solufontamide*, se traduit par une augmentation considérable de ce pouvoir inhibiteur.

CHAPITRE XVI

INFLUENCE DE DIFFÉRENTS ACIDES ET SELS ORGANIQUES

- ACIDE IODOACÉTIQUE -

TABLEAU n° 112 -

Concentration finale en acide iodoacétique		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	0,5 x 10 ⁻²	1 x 10 ⁻²
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	4,6	4,5
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	18	18	17	8	2	0
	1 h.	31	31	29	13	3	1
	2 h.	49	49	45	18	5	2
	3 h.	59	59	53	22	7	3
	4 h.	64	64	57	27	8	4
% d'inhibition pour	½ h.	-	0	5	55	88	100
	1 h.	-	0	6	58	90	96
	2 h.	-	0	8	63	90	96
	3 h.	-	0	10	62	88	95
	4 h.	-	0	10	58	87	93

- SEL DE SEIGNETTE - (tartrate double de potassium et de sodium) -

P.M. 282,19 $C^4H_4O_6 K Na$, 4 H₂O

TABLEAU n° 113 -

Concentration finale en sel de seignette		témoin	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	18	17	18	18	17	17
	2 h.	45	45	45	44	44	44
	4 h.	61	61	60	61	60	60

- TARTRATE BORICO POTASSIQUE -

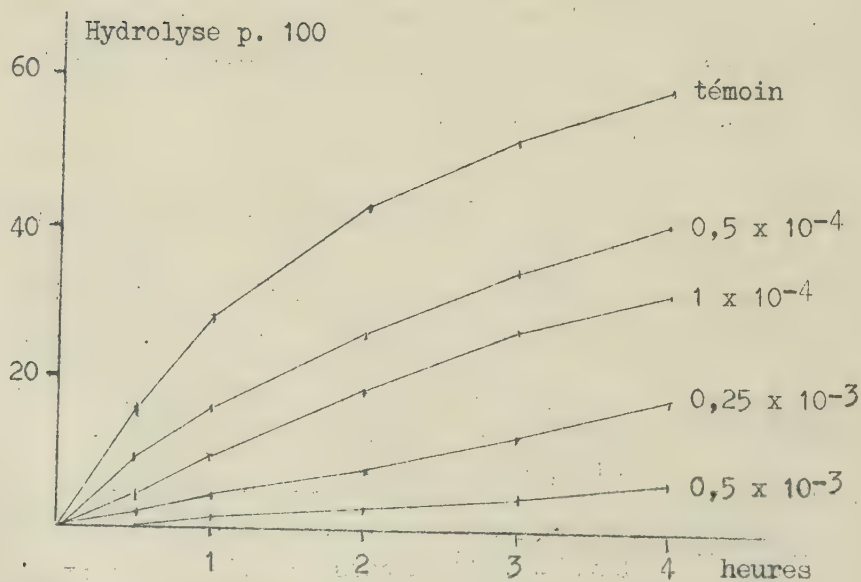
Pour cet effecteur, on ne peut pas examiner l'influence des concentrations supérieures à 1×10^{-3} à cause du développement d'une coloration jaune très intense après addition des deux gouttes de perchlorure de fer.

(voir tableau et schéma page suivante)

TABLEAU n° 114 -

Concentration finale en tartrate borico K		tém.	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	0,5 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻⁴	0,25 x 10 ⁻³	0,5 x 10 ⁻³
pH du mélange réact.		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	16	16	13	8	4	2	0
	1 h.	28	28	25	15	9	4	1
	2 h.	42	42	39	25	18	7	2
	3 h.	51	51	49	34	26	12	4
	4 h.	58	58	54	40	31	17	6
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	19	50	75	87	100
	1 h.	-	0	11	46	68	85	96
	2 h.	-	0	7	40	57	83	95
	3 h.	-	0	4	33	49	76	92
	4 h.	-	0	7	31	46	71	90

- SCHEMA XX -



Influence du tartrate borico-potassique.

- ACIDE CITRIQUE -

TABLEAU n° 115 -

Concentration finale en acide citrique		témoin	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	0,5 x 10 ⁻³	0,5 x 10 ⁻²
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	4,9	4,2
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	17	17	16	17	16	10
	2 h.	41	40	41	41	40	35
	4 h.	56	56	55	56	54	48

- FUMARATE DE SODIUM -

TABLEAU n° 116 -

Concentration finale en fumarate de sodium		témoin	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	0,5 x 10 ⁻²
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	4,7
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	13	13	12	13	12,5	13
	1 h.	23,5	24	24	23	23	23,5
	4 h.	54	55	55	54	54	52

- ACIDE SUCCINIQUE -

TABLEAU n° 117 -

Concentration finale en acide succinique		témoin	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	4,9	4,2
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	14	14	14	15	14	11
	2 h.	38	37	38	38	37	33
	4 h.	55	55	54	55	54	48

- BORATE DE PHENYL MERCURE -

TABLEAU n° 118 -

Concentration finale en borate de phényl Hg		témoin	1 x 10 ⁻⁷	1 x 10 ⁻⁶	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	0,5 x 10 ⁻³
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	½ h.	14	14	13,5	13	7	1
	1 h.	24	24	23	22	13	3
	2 h.	38	38	37	36	25	7
	3 h.	47	48	47	45	34	12
	4 h.	55	55	54	53	41	17
% d'inhibition pour	½ h.	-	0	3	7	50	93
	1 h.	-	0	4	8	46	87
	2 h.	-	0	3	5	34	82
	3 h.	-	0	0	4	28	74
	4 h.	-	0	2	4	25	69

- BARBITAL - (Véronal sodique) - Diéthylmalonylurée -

Les concentrations supérieures à $2,5 \times 10^{-3}$ communiquent un pH trop différent de 5,0 au mélange réactionnel pour pouvoir étudier leur influence propre sur la réaction enzymatique.

TABLEAU n° 119 -

Concentration finale en barbital		témoin	1×10^{-5}	1×10^{-4}	$0,5 \times 10^{-3}$	1×10^{-3}	$2,5 \times 10^{-3}$
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,2
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	17	17	17	17	16	13
	1 h.	30	30	30	30	28	22
	2 h.	45	45	45	45	43	35
	3 h.	54	54	54	54	52	43
	4 h.	60	60	60	61	58	49
% d'inhibition pour	$\frac{1}{2}$ h.	-	0	0	0	6	23
	1 h.	-	0	0	0	7	26
	2 h.	-	0	0	0	4	22
	3 h.	-	0	0	0	4	20
	4 h.	-	0	0	0	3	18

Nous avons récapitulé dans le tableau 120 les pourcentages d'inhibition relatifs à une heure d'incubation et dus aux différents effecteurs expérimentés dans ce chapitre.

Comme on l'a vu dans les tableaux partiels précédents, certaines de ces substances modifient, à concentration élevée, le pH du milieu réactionnel. Réserve faite de ces modifications qui correspondent à des concentrations extrêmes, nous pouvons dire que le sel de seignette, l'acide citrique, le fumarate de sodium et l'acide succinique sont pratiquement indifférents.

Le barbital est faiblement inhibiteur à 1×10^{-3} , l'acide iodoacétique fortement inhibiteur à la même concentration. Le tartrate borico potassique et le borate de phényl mercure possèdent un pouvoir inhibiteur appréciable dès la concentration 1×10^{-5} .

Il est donc intéressant de souligner que les acides succinique, fumarique et citrique (acides physiologiques par excellence, puisqu'ils entrent dans la composition du fameux cycle de KREBS) ne possèdent aucune action inhibitrice sur l'enzyme envisagé. Nous pouvons en dire de même des tartrates qui ne donnent rien sous la forme de sel double de sodium et de potassium. Par contre, ils sont très inhibiteurs sous la forme de tartrate borico-potassique ; nous retrouvons donc ici, comme dans le cas du borate phényl mercure, l'action inhibitrice marquée que nous avons déjà attribuée au borate. Il est à remarquer qu'à égalité de concentration, le borate de sodium est plus inhibiteur que le borate de phényl mercure.

TABLEAU n° 120 -

Effecteur	Concentration finale en effecteur											
	1 x	1 x	1 x	1 x	0,5 x	1 x	0,25 x	0,5 x	1 x	2,5 x	0,5 x	1 x
	10 ⁻⁸	10 ⁻⁷	10 ⁻⁶	10 ⁻⁵	10 ⁻⁴	10 ⁻⁴	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻³	10 ⁻²	10 ⁻²
Acide iodo- acétique	0	0	0	0	0	6	-	-	58	-	90	96
Sel de seignette	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Tartrate borico-K	0	0	0	11	46	68	85	96	-	-	-	-
Acide ci- trique	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-	-
Fumarate de Na	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-
Acide succinique	0	0	0	0	0	0	0	0	0	-	-	-
Borate de phényl Hg	0	0	4	8	-	46	66	87	-	-	-	-
Barbital	0	0	0	0	0	0	0	0	7	26	-	-

CHAPITRE XVII

INFLUENCE DE SUBSTANCES DIVERSES

Nous avons réuni dans ce chapitre l'étude du pouvoir anti ou pro-salicylsulfatasique d'un certain nombre de substances diverses n'entrant dans aucune des catégories étudiées dans les chapitres précédents.

- GLUCOSE -

TABLEAU n° 121 -

Concentration finale en glucose		témoin	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}	1×10^{-1}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	17	17	18	18	18
	2 h.	44	45	45	45	44	44
	4 h.	61	61	61	61	60	60

- PRISCOL* - (Tolazoline) -

Aucun résultat ne figure dans le tableau 122 pour les concentrations 1×10^{-1} et $0,5 \times 10^{-1}$, car le pH des mélanges réactionnels renfermant ces teneurs de priscol* est trop différent de 5,0.

TABLEAU n° 122 -

Concentration finale en priscol*		témoin	1×10^{-6}	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,4
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	18	17	17	18	18	15
	1 h.	28	28	27	28	27	25
	3 h.	51	52	51	51	52	48

- PRO-BANTHINE * - (Bromométhylate de β -diisopropylamino-éthyl-carboxy - 9 - xanthène).

TABLEAU n° 123 -

Concentration finale en pro-banthine*		témoin	1×10^{-5}	1×10^{-4}	1×10^{-3}	1×10^{-2}	$0,25 \times 10^{-1}$
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,2	5,4
Hydrolyse p. 100 après	$\frac{1}{2}$ h.	14	14	14	15	13	10
	2 h.	33	34	33	33	32	28
	4 h.	50	50	51	50	49	45

GLYCEROL -

Le produit employé est de la glycérine bidistillée R.P. densité 1,26 - formule $\text{CH}_2\text{OH} - \text{CHOH} - \text{CH}_2\text{OH}$ P.M. = 92,00

acidité % maxima : 1 ml /10

10 ml. de glycérol ont été placés dans un ballon de 100 ml. contenant déjà 0,262 grammes de salicylsulfate de sodium et nous avons complété jusqu'au trait de jauge avec du tampon acéto-acétique. A partir de cette solution, nous réalisons les autres milieux tampons (ainsi dans ce cas, les concentrations sont en volume et non comme généralement en poids).

TABLEAU n° 124 -

Concentration finale en glycérol		témoin	1 x 10 ⁻⁵	1 x 10 ⁻⁴	1 x 10 ⁻³	1 x 10 ⁻²	0,5 x 10 ⁻¹
pH du mélange réactionnel		5,0	5,0	5,0	5,0	5,0	5,0
Hydrolyse p. 100 après	1/2 h.	18	17	18	18	18	17
	3 h.	55	55	54	54	55	55
	5 h.	68	68	68	67	67	67

Il est intéressant de noter qu'aucune de ces substances, si étrangères qu'elles soient l'une de l'autre, ne possèdent, même à forte concentration, de propriété inhibitrice sur la salicylsulfatase ; ce caractère négatif prend même un intérêt particulier dans le cas du glucose, forme physiologique de transport et métabolite essentiel des glucides dans l'organisme.

Nous rapprocherons ces résultats de ceux obtenus par ROY (124) qui montra en 1936 que le glucose est très inhibiteur de la gluco-sulfatase de Charonia Lampas : en effet, ce dernier auteur, en ajoutant 3,6 g. de glucose à 40 ml. de milieu réactionnel (contenant 15 ml. de solution d'enzyme (Charonia), 20 ml. de glucosesulfate de baryum (0,20 N) et 5ml de solution tampon (acétate de baryum-acide acétique pH = 5,2) obtenait une inhibition de 98 p. 100 de l'activité glucosulfatasique pour une heure d'incubation et de 82 p. 100 pour 4 heures d'incubation.

CHAPITRE XVIII

REPARTITION DE LA "SALICYLSULFATASE"

Ainsi donc, comme nous venons de le voir, le S.D.H. constitue un milieu très riche en salicylsulfatase. Cette constatation vient confirmer les résultats princeps de DASTUGUE et BASTIDE (5) remontant à 1953 et qui, dès cette époque, avaient étendu l'étude de la répartition de la salicylsulfatase aux autres humeurs d'Hélix, à ses principaux tissus, ainsi qu'au sérum humain.

En ce qui nous concerne, nous avons cherché à mettre en évidence une répartition plus générale en nous adressant au sérum et aux tissus d'organes d'un certain nombre d'animaux qu'il nous a été possible de nous procurer.

1/- MODE OPERATOIRE ET RESULTATS :

A cet effet, nous avons pesé un poids p (10 g. en général) d'organe que nous avons d'abord noyé au mortier, puis mis en contact avec 100 ml d'eau distillée dans un mélangeur de Potter. Les broyats obtenus ont été filtrés, soit immédiatement, soit après un séjour de 24 ou 48 heures à 0° à la glacière pour un meilleur éclatement des cellules et ont servi à préparer des dilutions de 1/10 à 1/500.

La technique utilisée ici est celle qui a été décrite dans le premier chapitre de notre partie expérimentale, la seule différence résidant dans le remplacement de la dilution du S.D.H. par la préparation envisagée.

Nous avons testé ainsi des extraits de foie de boeuf, de veau, de porc, de cobaye, de poulet et de canard et aucun d'eux à n'importe quelle concentration expérimentée n'ont révélé la présence de la moindre activité salicylsulfatasique après des incubations de 2, 4 et 6 heures. N'ayant rien obtenu dans ces intervalles d'incubation relativement faibles, nous avons poursuivi le séjour à 37° C tout d'abord pendant 12 heures, puis durant 24 h., 48 h. jusqu'à 10 jours, en prenant soin alors de boucher les tubes et de réaliser des témoins où la préparation enzymatique est remplacée par un égal volume d'eau distillée. Les deux tubes correspondants (essai et témoin) ont montré la même activité salicylsulfatasique dans les deux cas, nous permettant de conclure à une hydrolyse spontanée (ou microbienne) mais pas une activité enzymatique proprement dite.

Nous avons obtenu les résultats consignés dans le tableau 125 (page suivante).

Nous avons également recherché un pouvoir salicylsulfatasique

TABLEAU n° 125 -

Temps d'incubation	1 jour	3 jours	5 jours	7 j.	9 j.	10 j.
Hydrolyse p. 100 dans le témoin	1	4	7	13	15	19
Hydrolyse p. 100 dans l'essai	1	5	7	12	15	19

Nous avons également recherché un pouvoir salicylsulfatasique dans le rein de porc en employant la même technique que précédemment. Dans ce cas, nous avons obtenu au bout de 6 heures, 4 p. 100 d'hydrolyse, indiquant ainsi la présence d'une trace d'activité salicylsulfatasique.

Par contre le rein de cobaye n'a pas révélé la présence ^{de} salicylsulfatase.

Enfin, plusieurs sérums (poulet, porc, boeuf, cheval, veau, lapin, canard, pintade, oie, pigeon) ont été expérimentés aux dilutions suivantes : 1/2, 1/5, 1/10, 1/20 et 1/50 et dans aucun cas, nous n'avons obtenu la moindre hydrolyse du salicylsulfate de sodium après les temps d'incubation inférieurs à 6 heures. Devant cette absence d'hydrolyse pour des séjours au thermostat relativement faible, nous avons une fois encore, poursuivi des hydrolyses pendant 1 jour, 2 jours, jusqu'à 12 jours en faisant accompagner chaque essai d'un témoin à l'eau distillée et nous avons obtenu dans les deux cas le même taux d'hydrolyse. En général, au bout de 5 jours d'incubation, on obtient 7 à 8 p. 100 d'hydrolyse dans tous les tubes (essais et témoins) et 23 à 25 p. 100 d'hydrolyse après 12 jours.

2/- INTERPRETATION ET DISCUSSION -

Cette absence de pouvoir salicylsulfatasique ne veut peut-être pas dire que les substrats soient totalement démunis de "salicylsulfatase", en effet :

a)- le sérum humain renferme 125 mg par litre de phosphore total et 35 mg de soufre total (le S protéinique non compris). Or, dans les chapitres précédents consacrés aux effecteurs, nous avons mis à plusieurs reprises en évidence le pouvoir inhibiteur des sulfates et des phosphates : 14 à 16 p. 100 d'inhibition aux concentrations de 1,5 p. 1.000 pour les uns et les autres. De plus, les chlorures présents dans le sérum à 4 g. par litre et un certain nombre d'autres substances minérales contribuant également à l'isotonie, peuvent vraisemblablement constituer un ensemble susceptible d'une action antagoniste vis-à-vis de notre enzyme. Il est donc fort possible que si nous avions pris soin de dialyser nos préparations enzymatiques, nous aurions pu déceler des traces de "salicylsulfatase" dans les liquides et tissus biologiques précédemment étudiés ?

b)- Ainsi, non seulement en extrapolant des constantes minérales

du sérum humain à celles correspondantes des sérums des animaux supérieurs qui n'en sont pas tellement différentes, nous concluons à l'existence de facteurs antagonistes faisant partie de la composition même du sérum, mais de plus, nous avons été assez heureux pour mettre en évidence une action inhibitrice exercée par ces mêmes sérums considérés dans leur totalité vis-à-vis d'autres milieux biologiques présentant normalement une activité salicylsulfatasique très appréciable. En effet, en mettant à incuber deux séries de tubes, les uns contenant une dilution de S.D.H. additionnée de sérum de poulet, de veau ou de cheval, et les autres une dilution de S.D.H. identique à la première mais additionnée du même volume d'eau distillée à la place du sérum (tous les tubes renfermant la même quantité de salicylsulfate de sodium: 1 ml. à 0,01 M), nous avons constaté, le pH étant le même dans les deux cas, 50 p. 100 d'inhibition pour $\frac{1}{2}$ heure d'incubation et 30 p. 100 pour 4 heures, quand le mélange réactionnel contenait 25 parties sur 100 de sérum de veau et des inhibitions d'un ordre identique ont été obtenues avec les sérums de poulet et de cheval.

c)- Enfin l'élimination du salicylsulfate de sodium a été étudiée in vivo par BASTIDE (4) en 1955 : après ingestion d'une prise de 500 mg de salicylsulfate de sodium, un sujet normal urine à des intervalles de temps déterminés et dans chaque miction, le médicament est dosé après extraction étherée sous sa forme libre (salicylate de sodium) ; et après hydrolyse en milieu alcalin au réfrigérant ascendant, puis extraction étherée en milieu acide, on dose la quantité totale de médicament éliminé (sous forme libre : salicylate et sous forme estérifiée : salicylsulfate de sodium). Le taux d'élimination globale par l'émonctoire rénal correspond à 61 p. 100 de la quantité totale ingérée. Cette élimination suit la loi exponentielle.

La quantité de médicament éliminé sous forme hydrolysée représente 36 p. 100 de la quantité ingérée et 45 p. 100 de celle éliminée. L'élimination débute au bout de 30 minutes et se termine 60 heures après. C'est ainsi que pour une prise buccale de 500 mg. on retrouve 307 mg éliminés sous les deux formes : libre et estérifiée, la forme libre y entrant pour 180 mg. De plus, l'élimination est la plus importante pendant les trente premières heures. Même en admettant un certain degré d'hydrolyse spontanée éventuel dans l'organisme (ne serait-ce qu'au niveau de la cavité gastrique), il n'en reste pas moins qu'une quantité relativement importante de salicylsulfate subit in vivo une hydrolyse qui ne saurait être que de nature enzymatique.

Cette constatation, faite en dehors de nous, par un expérimentateur poursuivant un but différent, vient à l'appui de l'hypothèse que nous avons formulée et suivant laquelle le fait que nous n'ayons pas réussi à mettre en évidence une action hydrolysante "in vitro" sous l'influence du sérum est dû fort probablement à la présence de facteurs antagonistes.

RESUME et CONCLUSIONS GENERALES

Après avoir, dans notre partie bibliographique, tracé un tableau d'ensemble des sulfatases, nous avons, dans notre partie expérimentale, étudié de façon aussi précise que possible, l'activité "salicylsulfatasique" du suc digestif d'Helix pomatia.

1/- Acidité ionique -

L'acidité ionique joue un rôle primordial sur l'activité de la "salicylsulfatase". Nous avons constaté que cette activité était presque totalement inhibée au-dessus de pH 6,0 et que la zone très acide (au-dessous de pH 4,5) gênait assez fortement le pouvoir salicylsulfatasique du S.D.H., le pH optimum se situant aux alentours de 5,0. Sur les cinq milieux tampons expérimentés, le milieu acéto-acétique s'est révélé de loin et même exclusivement le meilleur ; les tampons phosphates, citrate-phosphate, borax-acide succinique, barbital-acide chlorhydrique, soit par la nature de leurs constituants, soit par le pH qu'ils confèrent au milieu réactionnel, sont très défavorables.

2/- Température -

Dans nos conditions expérimentales, l'activité salicylsulfatasique présente un maximum à une température de 47° C pour des incubations de 3 à 4 heures et à 55° C pour des incubations de $\frac{1}{2}$, 1 et 2 heures, toutes températures supérieures amenant très rapidement une inhibition à peu près totale de l'enzyme.

Un préchauffage d'une demie-heure ne modifie pratiquement pas l'activité de la préparation enzymatique quand il est poursuivi à des températures ne dépassant pas 58° C. Mais à partir de 61° C, une partie du ferment est détruite, de sorte qu'un préchauffage durant une demie heure à 72° C supprime toute hydrolyse au cours des incubations ultérieures à 37° C d'une demie heure, une et deux heures et réduit l'activité au 1/10 de sa valeur quand cette incubation à 37° C se prolonge pendant 3 et 4 heures.

3/- Temps d'hydrolyse -

Durant les quatre premières heures, la vitesse d'hydrolyse en fonction du temps, nous permet de conclure à une réaction du 1er ordre et l'hydrolyse suit la loi exponentielle : $Q_t = K_0 (1 - a^{-\lambda t})$ avec une vitesse $V = 2,3 \times Q_{\infty} \times \lambda = 33 \text{ mg/heure}$ avec une dilution de S.D.H. 1/160. En d'autres termes, après $\frac{1}{2}$ h., 1 h., 2 h., 3 h., et 4 h. d'incubation, nous avons obtenu respectivement 14, 22, 33, 41 et 49 p. 100 d'hydrolyse, soit 29, 46, 69, 87 et 103 mg. de salicylsulfate hydrolysé par

ml. de S.D.H. pur.

4/- Temps de conservation -

Une dilution de S.D.H. conservée à + 4° C à la glacière garde une activité salicylsulfatasique constante au moins pendant trois à quatre mois, ne subissant durant ce laps de temps, ni diminution, ni augmentation. Cette constatation semblerait prouver d'une part, par comparaison avec des expériences analogues effectuées sur d'autres diastases, que la protéine enzymatique n'est pas sénapsée dans un complexe lipido-protéique et d'autre part que la salicylsulfatase est un enzyme très résistant.

5/- Concentration en enzyme -

Le pourcentage de substrat hydrolysé augmente avec la concentration en S.D.H. mais pour si sensible que soit cette augmentation, elle n'en est pas pour autant parallèle avec l'élévation de la quantité de S.D.H. contenue dans la dilution employée. En d'autres termes, une solution de S.D.H. 1/20 n'est pas six fois plus active qu'une solution de S.D.H. 1/120, elle l'est seulement 4 fois plus.

6/- Concentration en substrat -

On obtient les meilleurs pourcentages d'hydrolyse avec des concentrations en salicylsulfate voisines de 1×10^{-3} M. Pour des concentrations inférieures, le pourcentage d'hydrolyse du substrat décroît rapidement et pour des concentrations supérieures à 2×10^{-3} M, nous constatons également une baisse du pourcentage d'hydrolyse, mais beaucoup plus lente. Enfin si l'on considère non plus le pourcentage d'hydrolyse, mais bien la quantité de substrat hydrolysé par mg. de S.D.H. pur, on constate que celle-ci ne cesse de croître, exponentiellement d'ailleurs, avec l'augmentation de la concentration en salicylsulfate jusqu'à la concentration 5×10^{-2} M.

7/- Electrophorèse de zone -

De nombreux essais de migration électrophorétique comparée de sérum humain et de S.D.H., soit en tampon barbital-acide acétique pH 8,6, soit en tampon acéto-acétique pH 5,0, avec dans les deux cas une tension de 110 volts et une intensité de 2 milliampères, nous ont montré qu'après 13 heures de migration, le maximum d'activité enzymatique se trouvait à six centimètres du trait de départ. De plus, en tampon barbital, la protéine enzymatique semble migrer de la même manière que les β globulines du sérum humain.

8/- Effecteurs -

Dans les conditions expérimentales précises qui ont été exposées dans le texte, nous avons étudié l'action des effecteurs suivants :

a)- Parmi les anions envisagés, les fluorures (100 p. 100 d'inhibition à 1×10^{-3}); les borates (83 p. 100 d'inhibition à 1×10^{-4}),

les monosulfures (50 p. 100 d'inhibition à 1×10^{-4}) et les phosphates (98 p. 100 d'inhibition à 1×10^{-2}) sont les plus inhibiteurs ; viennent ensuite par ordre d'inhibition décroissante, les hyposulfites, arséniate, carbonate acide, sulfates, carbonate neutre, nitrate, chlorure (31 p. 100 d'inhibition à 1×10^{-2} et 85 p. 100 à 1×10^{-1}). L'iodure de potassium semble totalement sans action.

b)- Deux métaux semblent activateurs : le baryum (35 p. 100 d'activation à 1×10^{-3} , soit sous forme d'acétate, soit de nitrate) et l'uranium (30 à 40 p. 100 d'activation à 1×10^{-3} , soit sous forme d'acétate, soit de nitrate) ; par contre le mercure (Hg^{++}) semble très inhibiteur (100 p. 100 d'inhibition à 1×10^{-3} d'acétate ou de nitrate). En classant toujours par ordre de pouvoir inhibiteur décroissant, les sels minéraux étudiés peuvent se ranger ainsi : métavanadate d'ammonium (100 p. 100 d'inhibition à 1×10^{-5}), métamolybdate d'ammonium, acétate mercurique, chlorure mercurique, tungstate de sodium, nitrate d'argent, sulfate de cuivre, sulfate de zinc, nitrate de magnésium, citrate de lithium, acétate de nickel, chlorure de strontium (43 p. 100 d'inhibition à 5×10^{-2}). Le perchlorure de fer, l'acétate de cobalt, l'acétate de plomb semblent sans action.

c)- Toutes les eaux minérales étudiées se sont révélées inhibitrices pour notre enzyme, venant confirmer ainsi le rôle, en général très antagoniste des substances minérales relatées dans les paragraphes précédents.

Elles peuvent se classer ainsi qu'il suit par ordre de pouvoir inhibiteur décroissant vis-à-vis de la salicylsulfatase :

Salies-de-Béarn (100 p. 100 d'inhibition pour une teneur de 45 p. 100 en E.M.), La Bourboule, Vichy (Célestins), Uriage, Le Mont-Dore, Enghien, l'Hydroxydase du Breuil, Challes, Vittel (Grde Source), La Preste (36 p. 100 d'inhibition pour une teneur de 45 p. 100 en E.M.).

d)- Anticoagulants : nous retrouvons ici le pouvoir inhibiteur très marqué du fluorure. L'oxalate se comporte également comme un grand inhibiteur de la salicylsulfatase (96 p. 100 pour une concentration de 5×10^{-3}). Par contre, citrate, héparine et liquoïde* ne donnent aucune inhibition jusqu'à 1×10^{-4} et n'ont pu être étudié aux concentrations supérieures.

e)- Aucun des agents mouillants étudiés : Tween 20, taurocholate de sodium, B.D.A. , Uvéline*, Benzododécinium*, Biocidan*, Cétavlon* et Désogène* ne manifestent aux doses où nous avons pu les employer (c'est-à-dire la plupart du temps de $0,5 \times 10^{-5}$ à $0,5$ ou 1×10^{-3}) aucun effet appréciable sur l'activité de la salicylsulfatase.

f)- La plupart des alcaloïdes ne possèdent aucun pouvoir inhibiteur et parmi eux l'ésérine, réputé pour son pouvoir anti-estérasique très accusé n'inhibe que très faiblement la salicylsulfatase (80 p. 100 à 1×10^{-2}

et 50 p. 100 à 1×10^{-3}).

g)- Les antibiotiques fongiques n'ont pas d'action appréciable et en ce qui concerne les sulfamides, la molécule la plus simple (sulfanilamide) est la moins inhibitrice et l'introduction de tout radical étranger, qu'il s'agisse de la solumédine*, de la gantrisine* ou de la solufontamide*, se traduit par une augmentation considérable de ce pouvoir inhibiteur.

h)- Parmi les acides et sels organiques étudiés, le sel de seignette, l'acide citrique, le fumarate, l'acide succinique se sont montrés sans action jusqu'à la concentration 1×10^{-2} . Le barbital inhibe de 26 p. 100 à la concentration de $2,5 \times 10^{-3}$. Par contre, l'acide iodo-acétique (96 p. 100 d'inhibition à 1×10^{-2}), le tartrate borico potassique (96 p. 100 à 5×10^{-4}) et le borate de phényl mercure (87 p. 100 d'inhibition à 5×10^{-4}) ont fait montre d'un très grand antagonisme, retrouvant ici, l'action défavorable dévolue précédemment aux ions bore et mercurique.

i)- Enfin le glucose (jusqu'à la concentration 1×10^{-1}), le priscol* et la pro-banthine* sont indifférents sur l'activité de la salicylsulfatase.

9/- Répartition -

La répartition de la salicylsulfatase paraît de prime abord ne guère dépasser le suc digestif, les humeurs et les tissus d'Helix où elle avait été mise en évidence pour la première fois par DASTUGUE et BASTIDE en 1953. Toutes nos recherches pour établir une répartition plus générale en nous adressant aux sérums et aux tissus d'organes (foie, rein) d'un certain nombre d'animaux (cheval, boeuf, veau, cobaye, poulet, canard, porc, etc..) ne nous ont pas permis de déceler des traces appréciables de salicylsulfatase. Cette absence de toute activité enzymatique serait d'ailleurs peut-être moins due à un manque de salicylsulfatase qu'à la présence de facteurs antagonistes (sulfates, phosphates, etc..) contenues dans les préparations étudiées et venant masquer l'activité salicylsulfatase.

B I B L I O G R A P H I E

- 1 - ABBOTT L.D. - Jr. Fédération Proc., 1947 - 6 , p. 233
- 2 - ALBERT, BUCHNER et RAPP - Ber Dtsch. Chem. Ges. , 1902, 35, 2376
- 3 - ARNY et RING - J. Ind. Eng. Chem. , 1916, 8 , p. 316
- 4 - BASTIDE P. - Soc. Pharm. Clermont , 1955, in Bull. Soc. Pharm. Marseille , 1955, IV , n° 14, p. 191-194
- 5 - BASTIDE P. et DASTUGUE G. - C.R. Soc. Biol. 1953, 147, p. 1726
- 6 - BASTIDE P. - Thèse doct. Etat Pharm. Strasbourg, 1954, n° 13
- 7 - BASTIDE P. - Ann. Biol. Clin. , 1954, 12, 586
- 8 - BAYLE J. - Thèse doct. Pharm. Lyon , 1942, p. 194
- 9 - BESSEY O.A., LOWRY O.H. et BROCK M.J. - J. Biol. Chem. 1946, 164, p. 321.
- 10 - BIERRY H. et GIAJA J. - C.R. Acad. Sc. 1909, 148, p. 507-510.
- 11 - BIERRY H. et GIAJA J. - C.R. Acad. Sc. 1909, 148, p. 511.
- 12 - BLANQUET (Mme L.) - Ann. Inst. Hydr. Clermont-Fd, 1939, 3, 34-41
- 13 - BLANQUET (Mme L.) et ARMAND L. - Ann. Inst. Hydr. Paris, 1935, 10, 37
- 14 - BOIVIN R. - Thèse doct. Pharm. Paris, 1928
- 15 - BONSER G.M., CLAYSON D.B., JULL J.W. - Lancet , 1951, 11, p. 286
- 16 - BOYLAND E. - Bull. Soc. Chim. Biol. , 1956, n° 5 - 6, p. 827.
- 17 - BOYLAND E., MANSON D., SIMS P. et WILLIAMS D.C. -
- 18 - BOYLAND E., WALLACE D.M. et WILLIAMS D.C. - Brit. J. cancer, 1954, 9 , p. 62.
- 19 - BOUTRON et FREMY - Liebigs Ann. Chem. 1840, 34, p. 230
- 20 - BRAECKE - Journ. Pharm. Belgique 1928, 10, p. 481
- 21 - BUEHLER H., KATZMAN P. et DOISY E. - Fed. Proc. 1950, 9, p. 157
- 22 - BURKHARDT G.N. et LAPWORTH A. - J. Chem. Soc., 1926, 1 , p. 684
- 23 - BUSSY - Liebigs Ann. Chem. 1840, 34, p. 223
- 24 - BUTENDANDT A. et HOPVETTER H. - Ztschr. f. Physiol. Chem. 1939, 259 p. 222
- 25 - COHEN H. et BATES R. - Endocrinology , 1949, 44, p. 317

- 26 - COHEN H. et BATES R. - Endocrinology 1949, 45, p. 86
- 27 - COHEN H. et BITMAN J. - J. Biol. Chem. 1951, 191, p. 351
- 28 - COSTA O.A. - Rev. quim. e. farm. Rio-de-Janeiro 1937, 2, p. 71
- 29 - CZAPEK E. - Mh. Chem. 1924, 35, p. 635
- 30 - DASTUGUE G. - Thèse Doct. ès Sciences Nat. Lyon 1940
- 31 - DASTUGUE G. , BASTIDE P. et DUBIEF V. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1955, 37, p. 181 - 184.
- 32 - DASTUGUE G. et MATHON J. - Thérapie 1950, 5, p. 265
- 33 - DASTUGUE G. et FAVIER R. - Trav. Soc. Pharm. Montpellier 1951, 11, n° 2, p. 40-41.
- 34 - DASTUGUE G. et FAVIER R. - Thérapie, 1951, 5, p. 397
- 35 - DENIS W. - J. Biol. Chem. 1921, 47, p. 31
- 36 - DERRIEN M. - Bull. Soc. Chim. France (IV) , 1911, 2, p. 110
- 37 - DODEL P. et DASTUGUE G. - Ann. Inst. Hydr. Clermont-Fd. 1938
- 38 - DODGSON K.S. , LEWIS J.I.M. et SPENCER B. - Bio. Chem. J. 1953a, 55, p. 253 et 254.
- 39 - DODGSON K.S. et SPENCER B. - Bio. Chem. J. 1952, 51, XIX.
- 40 - DODGSON K.S. et SPENCER B. - Bio. Chem. J. 1952, 51, XIII
- 41 - DODGSON K.S. et SPENCER B. - Bio. Chem. J. 1953, 55, p. 315
- 42 - DODGSON K.S. et SPENCER B. - Bio. Chem. J. 1954, 57, p. 310
- 43 - DODGSON K.S. et SPENCER B. - Clinica Chimica acta , 1956, 1, p. 478
- 44 - DODGSON K.S. , SPENCER B. et WILLIAMS K. - Biochem. J. 1955, 61, 374
- 45 - DODGSON K.S., SPENCER B. et WILLIAMS K. - Biochem. J. 1956, 62, 5
- 46 - DODGSON K.S., SPENCER B. et WILLIAMS K. - Biochem. J. 1956, 64, n° 2, p. 216 - 221.
- 47 - DODGSON K.S., SPENCER B. et THOMAS J. - Biochem. J. 1953 b, 53, 452
- 48 - DUFF R. - J. Chem. Soc. 1949, p. 1597
- 49 - DUVAL A. et FISCHER P.H. - C.R. Soc. Biol. 1927, 96, p. 949.
- 50 - DZIALOSZYNSKI L.M. - Nature. Lond., 1947, 160, p. 464
- 51 - DZIALOSZYNSKI L.M. - Nature. Lond. , 1950, 166, p. 157
- 52 - EINBINDER J. et SCHUBERT M. - J. Biol. Chem. 1950, 185, p. 725
- 53 - ERDTMAN - Hoppe. Seylers Z. Physiol. Che. 1927, 171, p. 182.
- 54 - FISCHER P.H. - Thèse Doct. Sciences Paris 1931, p. 189

- 55 - FISCH G.R. - Nature, Lond. , 1955, 175, p. 735
- 56 - FISKE C.H. - J. Biol. Chem. 1921, 47, p. 26
- 57 - FONSS - BECH P. - Dansk. Tids. Farm. 1925, 9, p. 289 - 302
- 58 - FROMAGEOT Cl. - The enzymes , t. I , p. 513, Chapitre 13.
- 59 - FROMAGEOT Cl. - Biochem. Z. 1929, 208, p. 482
- 60 - FROMAGEOT Cl. - in The Enzymes par SUMMER J. et MYRBACK K.
Acad. Press. Inc. New-York 1950, 1, p. 517-526
- 61 - FUHNER H. - Bioch. Ztsch. , 1916, 77, p. 408
- 62 - GADAMER J. - Arch. Pharm. 235 , 1897. 44, p. 577.
Ber. Dtsch. Chem. Ges. 1897, 30, p. 2322
- 63 - GARBIT A. - Thèse Doct. Pharmacie Paris, 1932,
- 64 - GAUTIER-MOMBELET S. - Thèse Doct. Etat Pharmacie Strasbourg 1957.
- 65 - GIAJA J. - Thèse Doct. Sciences Paris , 1909
- 66 - GONNERMANN M. - Pflügers Arch. ges. Physiol. 1911, 137, p. 453
- 67 - GORIS A. et LIOT A. - Traité Pharm. Galénique, 1942, 1, p. 314
- 68 - GRAN G.A. et GLEN W.L. - J. Amer. Chem. Soc. 1949, 71, p. 2255
- 69 - GRASSMANN W., HANNIG K. et KNEDEL M. - Naturwiss, 1950, 37, 469.
- 70 - GUIGNARD L. - C.R. Ac. Sc. , 1890, III, 249, p. 920.
- 71 - GUILLAUME A. - Produits pharmaceutiques, 1951, vol. 6, p. 383.
- 72 - GUILLAUME A. - Note parue dans le "Pharmacien de France" 5/1/1953.
- 73 - HASLAM R.M. et KLYNE W. - Biochem. J. , 1953, 55, p. 340
- 74 - HASLEWOOD G.A.D. - Biochem. J. , 1952, 51, p. 139
- 75 - HAZARD R. et RAVASSE J. - C.R. Soc. Biol., 1945, 139, p. 13
- 76 - HENRY R. et THEVENET M. - Bull. Soc. Chim. Biol. Paris 1952, 34, 886.
- 77 - HENRY R., THEVENET M. et JARRIGE P. - Bull. Soc. Chim. Biol. Paris
1952, 34, p. 897.
- 78 - HERISSEY H. et BOIVIN R. - Journ. Pharm. et Chim. 1927, t. 5-6 385.
- 79 - HOLDEN G.W., LEVI I. et BROMLEY R. - J. Amer. Chem. Soc. 1949, 71,
p. 3844.
- 80 - HOLDEN R. et BROMLEY R. - J. Amer. Chem. Soc. 1950, 72, p. 3807
- 81 - HOMMERBERG Cl. - Koppe. Seylers Z. physiol. Chem. 1931, 200, p. 69
- 82 - HUGGINS C. et SMITH D.R. - J. Biol. Chem. 1947, 170, p. 391.
- 83 - HUGGINS C. et TALALAY P. - J. Biol. Chem. 1945, 159, p. 399.

- 84 - HUTBATKA - Ann. Chem. , 1843, t. XLVII , p. 153
- 85 - JARRIGE P. et HENRY R. - Bull. Soc. Chim. Biol. 1952, 34, p. 872-885.
- 86 - JAYLE M.F. et BEAULIEU E.E. - Bull. Soc. Chim. Biol. Paris, 1954, 36, p. 1391.
- 87 - JENSEN C. et TOTTERMAN L. - Nature, 1952, 169, 9, p. 374.
- 88 - JENSEN C. et TOTTERMAN L. - Acta Endoc. , 1953, 9, p. 36
- 89 - KLYNE W. - Progress in stéréochimistry, London . Butterworths, 1955 vol. 1.
- 90 - KOLTHOFF - Säure Basen, Indikatoren, Springer, 1932
- 91 - LECLERC H. - Docteur - "Les Epices".
- 92 - LEVENE P.A. - Monographs of the Rockefeller Inst. for Med. Res. no., 1922, 18
- 93 - LEVENE P.A. et LOPEZ-SUAREZ J. - J. Biol. Chem. 1918, 36, p. 105
- 94 - LINEWEAVER H. et BURK D. - J. Amer. Chem. Soc. 1934, 56, p. 658.
- 95 - LOEPER M., COTTET S. et PARROT J. - L'acide salicylsulfurique,
C.R. Soc. Biol., 18.6.1941, 135, p. 917.
- 96 - MATHON J. - Thèse Docteur Univ. Pharm. Strasbourg 1950, p. 98
- 97 - MICHAELIS L. et MENTEN M.L. - Biochem. Z. , 1913, 49, p. 333.
- 98 - MORIMOTO K. - Biochem. J. Tokyo, 1937, 26.
- 99 - MUNSON P.I., GALLAGHER T.F. et KOCH F.C. - J. Biol. Chem. 1944, 152, p. 67 .
- 100 - NEUBERG C. - Naturwiss., 1924, 12, p. 797.
- 101 - NEUBERG C. et CAHILL W.L. - Enzymologia , 1936, 1, p. 22
- 102 - NEUBERG C. et HOFMANN E. - Biochem. Z. 1931, 234, p. 345
- 103 - NEUBERG C. et KURONO K. - Biochem. Z. 1923, 140, p. 295
- 104 - NEUBERG C. et LINHARDT K. - Biochem. Z. 1923, 142, p. 191
- 105 - NEUBERG C. et RUBIN O. - Biochem. Z. 1914, 67, p. 82
- 106 - NEUBERG C. et SIMON E. - Sulfatase und ihre wirkungen, Suppl. I , 1936, p. 171.
- 107 - NEUBERG C. et Von SCHOENEBECK O. - Naturwiss., 1933, 21, p. 404 ,
Biochem. Z. 1933, 265, p. 223
- 108 - NEUBERG C. et WAGNER J. - Biochem. Z. 1925, 161, p. 492
- 109 - NEUBERG C. et WAGNER J. - Biochem. Z. 1926, 174, p. 457
- 110 - NEUBERG C. et WAGNER J. - Z. exper. Med. 1927, 56, p. 334

- 111 - NEUBERG C. et WAGNER J. - Sulafatasen in Oppenheimer : Methodick d. Fermente, p. 760.
- 112 - NOGUSHI J. - Biochem. Z. 1923, 144, p. 138
- 113 - ODELL L. FISHMAN-HEPPEN W. - Science, 1948, 108, p. 355.
- 114 - OPPENHEIMER C. - Die Fermente und ihre wirkungen, Leipsig, 1925, 5^o édition, pt. I .
- 115 - OPPENHEIMER C. - Die Fermente und ihre wirkungen, suppl. I, 1936, p. 171.
- 116 - PATTERSON J. - British Med. J. , 1937, 2, p. 522.
- 117 - PATTERSON J.Y.F. et KLYNE W. - Biochem. J. 1948, 43, p. 614
- 118 - PERRAULT M. - Thérapie , n° 1, 1949 .
- 119 - PERROT Em. - Matières prem. usuelles du règne végétal, 1943-1944.
- 120 - PIGMAN W.W. - Advances in enzymol. , 1944, 4, p. 41
- 121 - POLONOSKI M. , NEUZIL E., BANDU L. et POLONOSKI J. - C.R. Soc. Biol. 1947, 141, p. 460
- 122 - ROBINSON D., SMITH J.N., SPENCER B. et WILLIAMS R.T. - Biochem. J. 1952, 51, p. 202.
- 123 - ROSENFELD L. - Biochem. J. 1925, 157, p. 434
- 124 - ROY A.B. - Biochem. J. , 1953 a, 53, p. 12
- 125 - ROY A.B. - Biochem. J. , 1953 b, 55, p. 653
- 126 - ROY A.B. - Biochem. J. , 1954 a, 57, p. 465
- 127 - ROY A.B. - Biochem. biophys. Acta, 15, p. 300
- 128 - ROY A.B. - Biochem. J. , 59, p. 8
- 129 - ROY A.B. - Biochem. J. , 1956, 62, p. 30-41
- 130 - SAVARD H., BAGNOLI E. et DOREMAN R.I. - Fed. Proc. 1954, 13, p. 289
- 131 - SAWJALOW W., - Hoppe Seyless Z. Physiol. 1923, 126, p. 219
- 132 - SCHNEIDER W., FISCHER H. et SPECHT - Ber. 1930, 63, p. 2787
- 133 - SCHNEIDER W. et LOHMAN W. - Ber. 1952, 45, p. 2954
- 134 - SCHULTZ O.E. et BARTHOLO E. - Arzneimittel Forschung, 1952, 2, n°11
- 135 - SCHULTZ O.E. , GMELIN R., KELLER A. - Nat. Forsch. B, Dtsch. 1953 8, n° p. 7-14
- 136 - SELIGMAN A.M., CHAUNCEY H.H. et NACHLAS M.M. - Stain Tech. 1951, 26, p. 19
- 137 - SELLIER J. - Thèse Doct. Sciences Paris, 1910-1911, p. 143

- 138 - SENAULT R. - Thèse de médecine, Nancy 17.6.1947
- 139 - SOBEL E. et SPOERRI P.E. - J. Amer. Chem. Soc. 1941, 63, p. 1259
- 140 - SODA T. - J. Fac. Sc. Tokyo Univ. 1936, 3, p. 149
- 141 - SODA T. - J. Fac. Sc. Tokyo. Section I, 1936, 3, p. 150
- 142 - SODA T. et EGAMI E. - Bull. Chem. Soc. Japan, 1933, 8, p. 148
- 143 - SODA T. et EGAMI E. - J. Chem. Soc. Japan, 1933, 54, p. 1069
- 144 - SODA T. et EGAMI E. - J. Chem. Soc. Japan, 1934, 55, p. 256
- 145 - SODA T. et HATTORI Ch. - Bull. Chem. Soc. Japan, 1931, 6, p. 258
- 146 - SODA T. et HATTORI Ch. - Proc. Imp. Acad. Tokio, 1931, 7, p. 269
- 147 - SODA T. et HATTORI Ch. - Bull. Chem. Soc. Japan, 1933, 8, p. 65
- 148 - SODA T. et HATTORI Ch. - J. Chem. Soc. Japan, 1933, 54, p. 59
- 149 - SODA T. et KAWAMATSU S. - J. Chem. Soc. Japan, 1936, 57, p. 597
- 150 - SODA T. et KAWAMATSU S. - J. Chem. Soc. Japan, 1936, 57, p. 604
- 151 - SODA T., KATSURA T. et YODA O. - J. Chem. Soc. Japan, 1940, 61, 1227
- 152 - SODA T. et KOYAMA S. - J. Chem. Soc. Japan, 1935, 56, p. 1338
- 153 - STIGVEIBEL - in "The Enzymes" de SUMMER J.B. et MYRBACK K. - 1, 621
- 154 - STITCH S.R. et HALKERSTON I.D. - Nature Lond. 1953, 172, p. 398
- 155 - TALBOT N., RYAN J. et WOLFE J. - J. Biol. Chem. 1940, 132, 595
- 156 - TANAKA S. - J. Bio. Chem. Tokyo, 1938, 28, p. 119
- 157 - TANKO B. - Biochem. Z. 1932, 247, p. 486
- 158 - VENNING E.M., HOFFMAN M. et BROWNE J. - J. Biol. Chem. 1942, 146
p. 369.
- 159 - VERLEY A. - Bull. Soc. Chim. Franc. 1901, 25, p. 49
- 160 - VLITOS A.S. - Centr. Boyce Thompson Inst. 1953, 17, p. 127
- 161 - VON EULER H. - Chemie der enzyme, Munich 2^e édition, 1922, 2, 300
- 162 - VON EULER H. et ERIKSON St. - Fermentforschung 1926, 8, p. 518
- 163 - WEINMANN F. - Biochem. Z. 1929, 205, p. 214
- 164 - WERTHEIM T. - Ann. Chem. 1844, LII p. 52
- 165 - WEST O., REICH H. et SAMUELS L. - J. Biol. Chem. 1951, 193, p. 219
- 166 - WHITEHEAD J.E.M., MORRISON A.R. et YOUNG L. - Biochem. 1952, 51, 585
- 167 - WREDE - Ztschr. Physiol. Chem. 1922, 119, p. 46
- 168 - ZIMMERMANN W. - Ztschr. Physiol. Chem. 1935, 233, p. 257

INDEX ALPHABETIQUE DES SUBSTANCES ETUDIEES

	Pages
Acétate de baryum	100
Acétate de cobalt	113
Acétate mercurique	108
Acétate de nickel	113
Acétate de plomb	109
Acétate de potassium	97
Acétate d'uranium	106
Acide citrique	151
Acide iodoacétique	149
Acide succinique	151
Actinomycine	143
Antipyrine	139
Arséniate de sodium	92
Barbital sodique	152
B.D.A.	134
Benzododecinium*	134
Biocidan*	135
Borate de sodium	94
Borate de phényl mercure	151
Carbonate neutre de sodium	93
Carbonate acide de sodium	93
Cétavlon*	135
Citrate de lithium	97
Chlorpromazine (largactyl)	139
Chlorure ferrique	112
Chlorure mercurique	109
Chlorure de sodium	88
Chlorure de strontium	99
Cocaïne (base)	137

	Pages
Désogène*	135
Didromycine (base)	143
Didromycine (sulfate)	144
Dihydrooxy-codéinone	138
Eaux minérales	117
- Challes	125
- Enghien	126
- La Bourboule (Choussy)	119
- La Bourboule (Clémence)	119
- La Bourboule (Croizat)	120
- La Bourboule (Fenestre)	120
- Le Breuil (Hydroxydase)	124
- Le Mont-Dore (Bardon)	121
- Le Mont-Dore (César)	121
- Le Mont-Dore (Madeleine)	122
- Le Mont-Dore (Ramond)	122
- La Preste	125
- Salies-de-Béarn	123
- Uriage	126
- Vichy (Célestins)	123
- Vittel (Gde Source)	124
Esérine (sulfate)	139
Fluorure de sodium	87
Fumarate de sodium	151
Gantrisine* "Roche"	145
Glucose	155
Glycérol	156
Héparine	129
Héroïne	137

	Pages
Hyposulfite de sodium	90
Iodure de potassium	88
Isoniazide	144
Lignocaïne (xylocaïne)	138
Liquoïde*	130
Métavanadate d'ammonium	110
Molybdate d'ammonium	111
Monosulfure de sodium	89
Morphine	137
Nitrate d'argent	98
Nitrate de baryum	101
Nitrate de magnésium	99
Nitrate de sodium	91
Nitrate d'uranium	102
Oxalate de sodium	129
Phosphate disodique	92

	Pages
Plasma de Quinton	127
Priscol*	155
Pro-banthine*	155
Procaïne	138
Sel de Seignette	149
Solufontamide*	146
Solumédine*	145
Sulfanilamide	144
Sulfate de cuivre	98
Sulfate de sodium	91
Sulfate de zinc	108
Tartrate borico-potassique	149
Taurocholate de sodium	133
Tungstate de sodium	112
Tween 20	133
Uvéline	134

TABLE DES MATIERES

	Pages
INTRODUCTION.....	13
<u>Première Partie</u>	
<u>RECHERCHES BIBLIOGRAPHIQUES</u>	
<u>CHAPITRE I -</u>	
Généralités sur les sulfatases.....	17
<u>CHAPITRE II -</u>	
Applications biologiques et rôle physio-pathologique des sulfatases	29
<u>Deuxième Partie</u>	
<u>RECHERCHES EXPERIMENTALES</u>	
<u>CHAPITRE I -</u>	
Technique du dosage de l'activité enzymatique.....	37
<u>CHAPITRE II -</u>	
Influence de l'acidité ionique et de la nature du tampon.....	45
<u>CHAPITRE III -</u>	
Influence de la concentration du milieu tampon acéto-acétique.....	55
<u>CHAPITRE IV -</u>	
Influence de la température.....	59
<u>CHAPITRE V -</u>	
Influence du temps.....	65
<u>CHAPITRE VI -</u>	
Influence de la concentration en enzyme et en substrat.....	71
<u>CHAPITRE VII -</u>	
"Salicylsulfatase" et électrophorèse de zone.....	79
<u>CHAPITRE VIII -</u>	
Effecteurs.....	85

	Pages
<u>CHAPITRE IX -</u>	
Influences de quelques anions	87
<u>CHAPITRE X -</u>	
Influence de quelques sels	97
<u>CHAPITRE XI -</u>	
Influence des eaux minérales	117
<u>CHAPITRE XII -</u>	
Influence des anticoagulants	129
<u>CHAPITRE XIII -</u>	
Influence des agents mouillants	133
<u>CHAPITRE XIV -</u>	
Influence de quelques alcaloïdes et substances assimilées	137
<u>CHAPITRE XV -</u>	
Influence de divers antibiotiques et de quelques substances assimilées	145
<u>CHAPITRE XVI -</u>	
Influence de différents acides et sels organiques	149
<u>CHAPITRE XVII -</u>	
Influence de substances diverses	155
<u>CHAPITRE XVIII -</u>	
Répartition de la "salicylsulfatase"	157
<u>RESUME et CONCLUSIONS GENERALES</u>	161
<u>BIBLIOGRAPHIE</u>	165
<u>INDEX ALPHABETIQUE DES SUBSTANCES ETUDIEES</u>	171

Vu, Clermont-Ferrand, le 12 Juin 1957

Le Président du Jury,

G. DASTUGUE

Vu et approuvé :

Clermont-Ferrand, le 3 Juillet 1957

Le Doyen de la Faculté mixte de
Médecine et Pharmacie

G. PATURET

Vu et permis d'imprimer :

Clermont-Ferrand, le 5 Juillet 1957

Le Recteur de l'Académie,
Président du Conseil de l'Université

P. LOUIS

